



Universidade de Aveiro Departamento de Química
Ano 2011

**Clara Sofia
Oliveira
Lourenço**

**Deteção Molecular de Agentes Infecciosos em
Suínos**



Universidade de Aveiro Departamento de Química
Ano 2011

**Clara Sofia
Oliveira
Lourenço**

Detecção Molecular de Agentes Infecciosos em Suínos

Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Biotecnologia Alimentar, realizada sob a orientação científica do Doutor Jorge Saraiva, Investigador Auxiliar do Departamento de Química da Universidade de Aveiro, e da Mestre Sandra Balseiro, Directora Técnica da Genebox.

À minha mãe, ao Bruno e ao Silvino

o júri

presidente

Prof. Doutor João Manuel da Costa e Araújo Pereira Coutinho
Professor associado do Departamento de Química da Universidade de Aveiro

Prof. Doutor Jorge Manuel Alexandre Saraiva
Professor investigador auxiliar do Departamento de Química da Universidade de Aveiro

Mestre Sandra dos Santos Caramujo Balseiro
Directora técnica da Genebox

Doutora Isabel da Silva Henriques
Investigadora do Centro de Estudos do Ambiente e do Mar (CESAM) da Universidade de Aveiro

agradecimentos

Agradeço ao Prof. Dr. Jorge Saraiva, pela orientação científica deste trabalho.
Agradeço ao Prof. Dr. João Coutinho, Prof. Dr. Carlos Faro e Dr. Carlos Ferrer Antunes a oportunidade de desenvolver este projecto na Genebox, Lda.
Agradeço à Dra. Margarida Lourenço as suas críticas e sugestões como especialista na área Veterinária.
Agradeço, em especial, à Dra. Sandra Balseiro pelo seu extraordinário apoio, os seus ensinamentos e a sua amizade, que foram fundamentais para a realização deste trabalho.
Agradeço, ainda, a todas as pessoas que trabalham na Genebox e Biofairway, nomeadamente à Dra. Anabela Almeida, pelo apoio na obtenção de dados e pela simpatia com que sempre me trataram.
Finalmente, agradeço à minha família e amigos por todo o carinho e compreensão pelas horas que não lhes dediquei.

palavras-chave

agentes infecciosos, patogenecidade, PCR, DNA, RNA, Soro, Suínos.

resumo

A detecção de agentes infecciosos em suínos tem tido um papel cada vez mais relevante no sucesso económico das suiniculturas. O presente estudo teve como base a identificação molecular de 12 agentes patogénicos responsáveis por patologias em suínos. Este trabalho teve como objectivos: a optimização de técnicas de tipagem molecular de agentes infecciosos; a determinação de frequências de infecção de bactérias e vírus e a sua prevalência na população suína. A avaliação dos diferentes agentes infecciosos foi realizada em amostras de soro de 100 animais provenientes de diferentes suiniculturas. Para a cada um destes agentes foi desenvolvida uma técnica de tipagem molecular específica. Todas as amostras foram tipadas por PCR para os diferentes agentes infecciosos: *Actinobacillus pleuropneumoniae*; Género *Brachyspira*; Género *Chlamydia*; Género *Leptospira*; Género *Salmonella*; *Haemophilus parasuis*; *Influenza A*; *Lawsonia intracellularis*; *Mycoplasma hyopneumoniae*; *Porcine circovirus type 2*; *Pasteurella multocida*; Vírus da Síndrome Respiratório e Reprodutivo dos Suínos. Neste estudo os vírus PRRS, *Influenza A* e PCV2 foram os agentes patogénicos com maior percentagem de incidência na amostragem, na ordem dos 33 a 35%. Por outro lado, o género *Salmonella* apresentou a menor taxa de incidência amostral com apenas 1% de positividade. Os restantes agentes infecciosos alcançaram níveis de prevalência muito variáveis entre os 5 e os 18%. Os resultados alcançados neste estudo provaram estar de acordo com os referenciais Portugueses e Europeus, sendo não significativas as diferenças verificadas. Verificou-se ainda, que os 12 agentes infecciosos estudados são responsáveis por causar doenças respiratórias, reprodutivas e intestinais em suínos, sendo as mais prevalentes as doenças respiratórias. Concluindo, os testes de detecção molecular dos agentes infecciosos são um bom método de *screening* de microrganismos em suínos, apresentando bons níveis de sensibilidade e especificidade.

Keywords

Infectious agents, pathogenic, PCR, DNA, RNA, serum, swine.

Abstract

The detection of infectious agents in pigs plays a progressively important role in the economic success of pig farms. This study was based on the molecular identification of 12 pathogens agents responsible for pigs diseases. This work aims were: infectious agents molecular typing optimization, bacteria and viruses infection frequencies determination and their prevalence rates. Assessment of the different infectious agents was performed on serum samples from 100 animals from different pig farms. For each of these agents a specific molecular typing technique was developed. All samples were typed by PCR for the different infectious agents: *Actinobacillus pleuropneumoniae*; *Brachyspira* sp., *Chlamydia* sp., *Leptospira* sp., Genus *Salmonella*, *Haemophilus parasuis*, *Influenza A*, *Lawsonia intracellularis*, *Mycoplasma hyopneumoniae*, *Porcine circovirus Type 2*, *Pasteurella multocida*; *Swine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus*. In this study the *PRRS*, *Influenza* and *PCV2* virus were the pathogens with the highest incidence rate in our sample, with 33 to 35% rates. On the other hand, the genus *Salmonella* had the lowest incidence rate sampling with only 1% positivity. The other infectious agents have achieved levels of prevalence varying widely between 5 and 18%. The results achieved in this study proved to be in agreement with the Portuguese and European benchmarks, with no significant differences observed. It was also found that the 12 studied infectious agents are responsible for causing respiratory diseases, reproductive and intestinal tracts of pigs, the most prevalent respiratory diseases. In conclusion, molecular testing for infectious agents is a good microorganisms screening method for pigs, showing good levels of sensitivity and specificity.

Índice

Índice	8
Índice Tabelas	12
Índice Figuras	12
Índice Gráficos	13
1. Introdução.....	14
1.1. Enquadramento geral	14
1.2. Impacto de agentes infecciosos nas explorações suinícolas	16
1.3. Agentes Infecciosos em suínos	18
1.4. Técnicas de Diagnóstico de Agentes infecciosos	34
1.4.1. Diagnóstico molecular de agentes infecciosos	35
1.4.2. Detecção de agentes infecciosos por PCR.....	37
2. Objectivos.....	42
3. Material e Métodos.....	42
3.1. Amostragem.....	42
3.2. Isolamento do soro	42
3.3. Extracção de DNA	43
3.4. Extracção de RNA	43
3.5. Síntese de cDNA.....	44
3.6. Análise da pureza e quantificação dos ácidos nucleicos (DNA e RNA)	45
3.7. Desenho e optimização de <i>Primers</i>	46
3.8. Detecção de agentes infecciosos por PCR.....	47
3.9. Electroforese em gel de agarose	48
3.10. Detecção de sensibilidades analíticas por PCR.....	49
3.11. Análise estatística dos resultados	50
3.11.1. Pureza e concentração das amostras biológicas	50
3.11.2. Frequências de infecção dos diferentes vírus e bactérias	50
3.11.3. Frequências de infecção obtidas versus frequência geral de infecção em Portugal e Europa	50

3.11.4.	Frequências de infecção múltipla	50
3.11.5.	Frequências de infecção por grupo patológico	51
4.	Resultados e Discussão	52
4.1.	Pureza e concentração das amostras biológicas.....	52
4.2.	Especificidade e sensibilidades analíticas de detecção por PCR	53
4.3.	Detecção de agentes patogénicos por PCR e taxas de infecção.....	55
4.3.1.	Taxas de infecção múltipla	59
4.3.2.	Taxas de infecção por grupos patológicos.....	65
5.	Conclusão	71
6.	Anexos.....	73
7.	Bibliografia.....	77

Abreviaturas

APP- *Actinobacillus pleuropneumoniae*

AL- tampão de lise

cDNA- ácido desoxirribonucleico complementar

°C- grau Celcius

DNA- ácido desoxirribonucleico

dNTPs- desoxirribonucleotídeos

DO- densidade óptica

ELISA- teste imunoenzimático

g- grama

g- força gravítica

Kb- Kilobases

MgCl₂- cloreto de magnésio

ml- mililitro

m²- unidade de medida metro quadrado

mM- milimolar

Mg²⁺- Magnésio

mRNA- ácido ribonucleico mensageiro

ng- nanogramas

nm- nanómetros

nM- nanomolar

ORFS- regiões abertas de leitura

PBS- Tampão fosfato salino

PCR- reacção em cadeia da polimerase

PCR-SSP- reacção em cadeia da polimerase com *primers* específicos

PCV 2- *circovirus* suíno do tipo 2

PRRS- Síndrome Reprodutiva Respiratória de Suínos

rDNA- ácido desoxirribonucleico ribossómico

rpm- rotações por minuto

RNA- ácido ribonucleico

RT- transcriptase reversa

SDS- Dodecil Sulfato de sódio

Tm- temperatura de fusão

UV- ultravioleta

μl-microlitro

μg- microgramas

μm- micrómetro

% - percentagem

Índice Tabelas

Tabela 1- Espécies de <i>Actinobacillus</i> e os patógenos primários correspondentes, adaptado de [19].	19
Tabela 2- Vacinas utilizadas para o tratamento de <i>PCV 2</i> , adaptado de [1].	22
Tabela 3-Taxonomia das bactérias <i>Chlamydia</i> , adaptado de [3].	24
Tabela 4- Espécies de <i>Haemophilus</i> estudadas em animais, adaptado de [19].	28
Tabela 5- Algumas vacinas utilizadas no tratamento de <i>Pasteurella multocida</i> , adaptado de [74].	32
Tabela 6 - Sintomas da <i>PRRS</i> nos diferentes estádios de desenvolvimento dos suínos, adaptado de [105].	33
Tabela 7-Características dos <i>primers</i> e Amplicação de cada agente patológico [24, 38, 54, 77, 82, 98, 119, 123, 126, 129, 132, 135].	46
Tabela 8-Parâmetros do programa de PCR.	48
Tabela 9- Médias dos dados de pureza e concentração das amostras de DNA.	52
Tabela 10- Médias dos dados de pureza e concentração das amostras de RNA.	53
Tabela 11- Médias da sensibilidade e especificidade dos <i>primers</i> para cada agente infeccioso [24, 38, 54, 77, 82, 98, 119, 123, 126, 129, 132, 135].	54
Tabela 12- Frequências de infecção para cada agente infeccioso estudado nas diferentes populações analisadas. (NS – Não Significativo)	56
Tabela 13- Taxa de infecção múltipla nos diferentes agentes infecciosos (n = número de amostras infectadas).	60
Tabela 14- Agentes infecciosos responsáveis por doenças respiratórias.	66

Índice Figuras

Figura 1- Os países onde foi previamente detectada a SMDS estão identificados a vermelho, adaptado de [1].	22
Figura 2-Epidemiologia de Leptospirose em animais e humanos, adaptado de [4].	26
Figura 3- Origem e transmissão do vírus <i>Influenza</i> , adaptado de [78].	30
Figura 4 – Representação esquemática das fontes de ácidos nucleicos para a reacção de PCR e dos métodos para qual a PCR pode servir, adaptado de [2].	36

Figura 5 – Termociclador MyCycler da Biorad.	38
Figura 6-Esquema da síntese de cDNA, reacção de transcrição reversa, adaptado de [141].	45
Figura 7- Espectrofotómetro da <i>GeneQuant pro</i> (Biochron, Cambridge, Inglaterra), para quantificar os ácidos nucleicos.	45
Figura 8- Esquema do marcador de peso molecular 1 Kb DNA Ruler (molecular probes, London, UK) adaptado de [142].	49

Índice Gráficos

Gráfico 1 - Taxa de infecção múltipla de <i>APP</i> e outros agentes infecciosos.	62
Gráfico 2 - Frequências de infecção por grupo de doença.	66
Gráfico 3 - Percentagem de incidência dos agentes infecciosos que provocam doenças intestinais.	68
Gráfico 4 - Percentagem de incidência dos agentes infecciosos que provocam doenças reprodutivas.	69

1. Introdução

1.1. Enquadramento geral

O presente projecto foi realizado como estágio em ambiente empresarial, na empresa Genebox. A Genebox, fundada em 15 de Maio de 2003, é uma empresa de concepção, desenvolvimento e produção de testes de diagnósticos orientada exclusivamente para laboratórios (de análise ou de investigação) de biologia molecular. A empresa tem as suas instalações actuais no Biocant Park - Parque Tecnológico de Cantanhede. Neste Centro, tem disponível uma área global de 84 m², dos quais, 60 m² correspondem à área de controlo da qualidade e os restantes 24 m² à área de produção. A área de produção é uma "sala branca" altamente controlada e estéril, de acordo com as normas NP EN ISO 13485:2004 e NP EN ISO 9001:2008, onde são realizadas todas as actividades pré-PCR e de produção. A área de controlo de qualidade é uma área de médio controlo, onde são realizadas todas as actividades de PCR e pós-PCR [5]. Actualmente a empresa é constituída por colaboradores, com experiência e competência técnicas para dar resposta aos requisitos do mercado de testes de diagnóstico *in vitro*. A Genebox tem como princípios essenciais a constante actualização de todos os colaboradores nas mais recentes técnicas de concepção, desenvolvimento e produção [5].



As doenças de origem alimentar são cada vez mais uma preocupação. Estas doenças na maior parte das vezes são causadas principalmente por bactérias patogénicas, que são transmitidas aos seres humanos através do consumo de alimentos, com origem em animais doentes, ou que foram contaminados nas linhas de processamento. A carne de suínos é a carne mais consumida mundialmente. Assim existe a necessidade de uma produção isenta de infecções, para que o consumo da carne não traga problemas para a saúde pública [6].

A análise de vírus e bactérias tem evoluído significativamente no decorrer das últimas décadas, em grande parte devido ao desenvolvimento de técnicas moleculares que utilizam para controlo microbiológico de produtos alimentares, nomeadamente, produtos de origem animal. Previamente, os procedimentos que permitiam fazer a discriminação de isolados microbianos baseavam-se principalmente na comparação das

suas características fenotípicas, ou seja, pela análise das particularidades estruturais de cada um deles. Os métodos de tipagem molecular analisam uma parte ou a totalidade do genoma, pelo que são conhecidos por métodos de genotipagem. Os ácidos nucleicos (DNA e RNA) contêm informação e diversidade suficiente nas suas sequências para permitirem uma abordagem uniforme e simples com vista ao estudo da diversidade de bactérias e vírus. Um sistema eficiente de tipagem molecular deverá ter um elevado poder discriminatório, ou seja, permitir a diferenciação clara de um elevado número de estirpes, e possuir elevada reprodutibilidade [2, 7].

Este estudo teve como principais objectivos: a optimização de técnicas de tipagem molecular de bactérias e vírus patogénicos; a determinação de frequências de infecção; e a prevalência dos diferentes agentes infecciosos em animais de consumo humano. Neste trabalho, foram alvo de estudo os seguintes agentes infecciosos:

- *Actinobacillus pleuropneumoniae* - APP
- Género *Brachyspira*
- Género *Chlamydia*
- Género *Leptospira*
- Género *Salmonella*
- *Haemophilus parasuis*
- *Influenza A*
- *Lawsonia intracellularis*
- *Mycoplasma hyopneumoniae*
- *Porcine Circovirus Type 2 - PCV 2*
- *Pasteurella multocida*
- Vírus da Síndrome Respiratório e Reprodutivo dos Suínos -PRRS

1.2. Impacto de agentes infecciosos nas explorações suinícolas

A indústria suinícola tem vindo a sofrer mudanças consideráveis na última década, o tamanho das explorações tem vindo a aumentar, intensificando assim a produção de suínos [8]. As doenças provocadas por agentes infecciosos são sem dúvida uma preocupação emergente neste tipo de explorações, não só devido ao impacto causado na saúde e vida do animal, mas também devido ao seu impacto económico geral. Na Europa, até o final do ano 2000, diversos países viram as suas explorações ameaçadas pelo reaparecimento de algumas doenças, como a Febre Aftosa e a Peste Suína Clássica. O controlo e supressão destas doenças acarretaram graves repercussões económicas na indústria suinícola. No entanto, na América do Norte, muitas destas doenças foram erradicadas ou tiveram impacto reduzido nas explorações suinícolas, nomeadamente, a parvovirose suína, controlada por vacinação, a disenteria suína, a rinite atrófica e a pleuropneumonia contagiosa [9].

Nas explorações actuais, a intensidade, as altas densidades e os padrões de fluxo de animais facilitam a transmissão de agentes infecciosos. Nessas condições, os organismos evoluem e atingem maior grau de virulência sem provocar a manifestação clínica da doença. Contudo, os sistemas modernos de exploração suinícola têm tentado minimizar a transmissão e evolução destes agentes infecciosos [10]. A melhoria da qualidade das práticas de manuseamento e produção de suínos tem minimizado a evolução das doenças virais. No entanto, esta melhoria não tem tido efeito prático nalguns habitantes normais das mucosas dos suínos, como *Haemophilus parasuis* (poliserosites), *Streptococcus suis* (meningites) e *Actinobacillus suis*. Desta forma, agentes que raramente eram responsáveis por provocar problemas graves de doença nas explorações de suínos, são agora importantes focos de infecção. Para além disso, têm surgido novas síndromes, a maioria associada a doenças virais, provocando perdas económicas significativas na indústria suinícola, tais como a *Síndrome Respiratória e Reprodutiva Suína (PRRS)*, doenças associadas ao *Circovirus porcino tipo 2 (PCV-2)* e à *Influenza Suína* [11, 12].

O aumento das doenças, as mudanças nos fluxos de produção e a dinâmica das infecções criaram uma interacção complexa entre os agentes infecciosos virais e bacterianos que levou à necessidade de desenhar novos planos de prevenção e controlo [12]. Estes planos de controlo começam com um diagnóstico precoce e preciso dos agentes

infecciosos. Muitas vezes, estes agentes são indistinguíveis tanto através da avaliação dos sinais clínicos como das lesões macroscópicas, sendo assim necessário recorrer a métodos laboratoriais para a sua correcta identificação. Este diagnóstico permitiu a mudança da percepção sobre as doenças infecciosas. Esta percepção defendia que quando ocorria a exposição do animal a um agente infeccioso havia inevitavelmente a infecção por esse agente. Actualmente, a visão do processo infeccioso é vista como uma interacção multifactorial entre o agente infeccioso e o animal. Podendo, esta interacção levar à eliminação do agente presente no animal, convertendo o mesmo num portador assintomático ou sintomático. Uma vez que, o resultado do contacto entre os suínos e os agentes infecciosos depende do estado imunológico dos animais e das características de virulência da estirpe do agente infeccioso. Os padrões de doenças nas explorações suínolas estão em constante mudança porque cada vez mais, surgem novos vírus e bactérias responsáveis por causar novas infecções/doenças nos animais. O surgimento de novas doenças e o ressurgimento de doenças históricas relacionam-se com alterações nos agentes infecciosos e na ecologia dos suínos. Os factores ecológicos como, a mistura de animais, a densidade, o transporte, as práticas de manuseamento e mão-de-obra, desempenham um papel mais relevante na apresentação da doença do que na evolução dos vírus e hospedeiros. Todas estas modificações são preponderantes para a avaliação económica geral das explorações e que são tidas em conta aquando da análise da viabilidade das mesmas [13].

Os métodos de diagnóstico das doenças são um desafio constante devido à sua complexidade e aos custos associados. O principal objectivo destes métodos é determinação correcta do agente infeccioso que circula na exploração. A avaliação dos registos da exploração, dos exames clínicos, do fluxo de produção e dos testes sorológicos são meios importantes para o diagnóstico. Os registos clínicos ajudam a identificar o período de tempo no qual a população apresentou determinada sintomatologia clínica. Sendo preponderante estabelecer uma rotina de avaliação nos momentos de aplicação diária individual de antibióticos, ou uma avaliação dos gráficos ou registos da mortalidade associada à exploração, levando em consideração as características dessa mortalidade (idade, sexo, peso dos animais infectados, etc.). Devem realizar-se comparações entre alguns factores dos lotes dos animais existentes nas explorações, como por exemplo, nas diferentes fases do ciclo de produção, no tipo de instalações, no tipo de manuseamento

zootécnico (densidade, higiene, desinfecção, etc), na ventilação natural ou no ambiente controlado, etc. Quando a avaliação dos registos da exploração, dos exames clínicos do fluxo de produção ou da monitorização sorológica, não são suficientes para determinar o agente infeccioso responsável por determinada doença, recorre-se a métodos de diagnóstico especializados e mais dispendiosos, como por exemplo, PCR-reacção em cadeia da polimerase. Toda esta rotina de avaliação e registo, embora dispendiosa, é preponderante para a rentabilidade económica da exploração [14, 15].

1.3. Agentes Infecciosos em suínos

A detecção e identificação do agente causador da infecção são questões muito relevantes no diagnóstico de agentes infecciosos em suínos. A ocorrência e recorrência em todo o mundo de doenças transfronteiriças, como por exemplo da gripe A, mostra que existe uma elevada necessidade de detectar e controlar o agente infeccioso atempadamente. Ao saber precocemente da infecção a indústria suinícola poderá tratar devidamente o animal antes de este ir para os matadouros e servir para a alimentação humana [16, 17].

Os agentes infecciosos patogénicos (vírus e bactérias) são capazes de produzir doenças nos seus hospedeiros. Estes agentes existem em diversos ambientes/reservatórios (animais, alimentos, água, etc...), e o seu diagnóstico pode ser realizado de diversas formas. Nos últimos anos, as técnicas de biologia molecular têm sido cada vez mais utilizadas para identificação e detecção de bactérias e vírus nos laboratórios de microbiologia clínica [18, 19].

A ocorrência e recorrência de doenças transfronteiriças em todo o mundo, como a febre aftosa, a gripe A (*Influenza*), entre outras doenças, levam à necessidade de desenvolvimento de novos métodos diagnósticos poderosos, robustos e de alta capacidade, capazes de detectar os agentes causadores antes que eles se espalhem pelas populações e provoquem grandes perdas [17, 18, 20].

1.3.1. *Actinobacillus pleuropneumoniae*

Actinobacillus é uma bactéria gram-negativa, imóvel, em forma de bastonete, não formadora de esporos, que aparece como parasita ou patógeno em mamíferos, aves e

répteis. Estes géneros de bactérias são anaeróbios facultativos, capazes de fermentar carboidratos (sem produção de gás) e de reduzir nitratos e pertencem à família *Pasteurellaceae* [21, 22]. Existem várias espécies de *Actinobacillus* e cada uma tem o seu habitat preferido. Na Tabela 1 podemos identificar as diferentes espécies de *Actinobacillus* e o seu hospedeiro primário[19].

Tabela 1- Espécies de *Actinobacillus* e os patógenos primários correspondentes, adaptado de [19].

Espécies	Habitat principal	Hospedeiro primário	Potencial patogénico, doença
<i>A. arthritidis</i>	Cavidade oral	Cavalos	Patogénio oportunista, septicemia
<i>A. capsulatus</i>	Tracto respiratório superior	<i>Leporidae</i>	Artrite, septicemia
<i>A. equuli</i> subsp. <i>equuli</i> e <i>A. equuli</i> subsp. <i>haemolyticus</i>	Tracto intestinal e respiratório superior	Cavalos	Patogénio comensal e oportunista em potros (potro sonolento, nefrite e artrite) e em adultos (aborto, septicemia, nefrite e endocardite)
<i>A. lignieresii</i>	Tracto superior respiratório e intestinal	Gatos	Patogénio oportunista e comensal
<i>A. pleuropneumoniae</i>	Tracto respiratório superior	Suíños	Patogénio primário, pleuropneumonia
<i>A. suis</i>	Tracto respiratório superior	Suíños	Patogénio oportunista e comensal em leitões (principalmente septicemia) e em porcos (septicemia, pneumonia, artrite, enterite)
<i>[A.] indolicus</i>	Tracto respiratório superior	Suíños	Comensal
<i>[A.] minor</i>			
<i>[A.] porcinus</i>			
<i>[A.] rossii</i>	Tracto urogenital	Suíños	Patogénio oportunista, infecções no tracto reprodutivo
<i>[A.] seminis</i>	Tracto urogenital	Ovinos	Patogénio oportunista, epididimites
<i>[A.] succinogenes</i>	Tracto intestinal	Gatos	Comensal, produz ácido succínico usado indirectamente pelo hospedeiro
" <i>A. porcitonissillarum</i> "	Amígdalas	Suíños	Comensal, facilmente confundido com <i>A. pleuropneumoniae</i> , <i>[A.] minor</i>

O habitat natural destes agentes infecciosos é principalmente o trato respiratório e a cavidade oral [22]. Uma das espécies mais comuns em suínos deste género de bactérias é a

Actinobacillus pleuropneumoniae (APP), responsável por uma pneumonia que se espalha rapidamente [19].

O APP é do ponto de vista morfológico, um pequeno cocobacilo (0,5-1x1-2µm), gram-negativo, pleomórfico, imóvel, não esporulado e capsulado. Em culturas antigas, ou na ausência das condições óptimas de crescimento, podem ocorrer formas filamentosas, que são mais evidentes entre as 24 e as 96 horas de incubação [23].

O APP é considerado um parasita do trato respiratório suíno que causa pleuropneumonia nestes animais, sendo desconhecida a sua existência noutro tipo de animais [19, 24]. A doença está normalmente associada com a produção intensiva, estando a sua gravidade relacionada com factores ambientais e de manejo [23]. Este agente infeccioso pode ser isolado da cavidade nasal, amígdalas e dos pulmões de suínos infectados [24, 25].

O APP está presente nas secreções nasais e dos pulmões, é responsável por infecções agudas em animais e pode ocorrer transmissão desta bactéria por contacto directo com suínos ou transmissão de aerossóis. A pleuropneumonia pode ocorrer em suínos de todas as idades. Esta doença está associada a uma densidade elevada nas explorações, ventilações precárias e grandes diferenças de temperaturas. Muitos estudos indicam que esta bactéria não aparece no hospedeiro associada a outros agentes infecciosos, no entanto animais infectados com *Mycoplasma hyopneumoniae* demonstraram grande probabilidade de estarem infectados também com *A. Pleuropneumoniae* [21, 22, 25].

A incidência da doença pode variar entre crónica e superaguda, dependendo do sistema imunitário do animal [21, 22, 25]. Os suínos com doença superaguda ou aguda apresentam os seguintes sintomas: febre alta, aumento da frequência respiratória, tosse, espirros, dispneia, anorexia, vômitos, diarreia e insuficiência respiratória grave. As lesões pulmonares associadas à doença aguda e super aguda são caracterizadas por edema grave, inflamação, hemorragia e necrose [22, 26].

A prevenção e controlo desta doença podem ser realizados através de boas práticas de gestão das explorações, tais como controlo da qualidade do ar e da temperatura, evitar a superlotação e efectuar limpeza entre os diferentes grupos de população de animais. A vacinação dos animais é o melhor tratamento para esta doença, apesar de ainda não haver uma vacina completamente segura para protecção desta doença [19, 22].

1.3.2. *Circovirus porcino tipo 2: PCV-2*

O *Circovirus* pertence à família *Circoviridae*, que se subdivide em dois géneros: *Circovirus* e *Gyrovirus*. O género que se manifesta nos suínos pertence ao grupo dos *Circovirus*. O *Circovirus* do tipo 1 (*PCV-1*), ao contrário do *Circovirus* do tipo 2 (*PCV-2*), não apresenta patogenicidade em suínos. Este vírus é um contaminante persistente de linhagens de células renais PK-15 de suínos, sendo considerado não virulento [27, 28]. Por outro lado, o *PCV-2* está associado a várias doenças, sendo as duas principais: a Síndrome Multissistémica do Definhamento dos Suínos (SMDS) e a Síndrome da Dermatrite e Nefropatia suína (SDNS) [29, 30].

Os *Circovirus* suínos são vírus não encapsulados, relativamente pequenos de DNA circular de cadeia simples com aproximadamente 1.800 nucleotídeos [31]. O genoma é composto por 7 ORFs (“open reading frames”- regiões abertas de leitura). A ORF1 é localizada na vertente positiva e codifica duas isoformas da proteína *Rep* envolvidas na iniciação da replicação. A ORF2 é localizada na vertente negativa de replicação da cadeia dupla do genoma do *PCV-2* e codifica a proteína *Cap* que compõe o capsídeo do vírus. A ORF3 está envolvida na indução de apoptose e as outras ORFs apresentam actividade ainda desconhecida, podendo representar um papel importante na replicação viral e/ou na patogenia [32].

A SMDS é uma doença emergente caracterizada pelo atraso de crescimento, emagrecimento progressivo, palidez da pele, anemia, dispneia e aumento na taxa de mortalidade. Esta doença foi descrita pela primeira vez no Canadá em 1991, e actualmente está presente na produção de suínos em todo o mundo, Figura 1 [1, 30]. O *PCV-2* também está relacionado com a SDNS, doença do complexo respiratório, digestivo e reprodutivo [27]. Esta patologia foi descrita pela primeira vez em 1993 no Reino Unido [27], os seus sintomas são: lesões na pele; falta de apetite; perda de peso excessiva; e dificuldades de locomoção. Os animais com esta doença morrem rapidamente, estando a causa de morte relacionada com uma insuficiência renal aguda [27].

A prevenção e controlo desta doença podem ser realizados através de boas práticas de higiene/gestão das explorações, tais como: controlo da qualidade do ar e da temperatura; a limpeza dos espaços e a gestão do número de animais por metro quadrado. A vacinação

dos animais, Tabela 2, é o melhor meio de tratamento e prevenção de doenças transmitidas pelos vírus *PCV-2* [1, 33-35].

Tabela 2- Vacinas utilizadas para o tratamento de *PCV 2*, adaptado de [1].

Vacina	Empresa	Antigénio
Ingelvac circoflex	Boehringer Ingelheim	Proteína ORF2 PCV2
Suvaxyn PCV2	Fort Dodge Pfizer	Inactiva PCV1-2
Porcilis PCV (EU)/ Circumvent PCV (US)	Intervet–Schering Plough Animal Health	Proteína ORF2 PCV2
Circovac	Merial	Inactiva PCV2

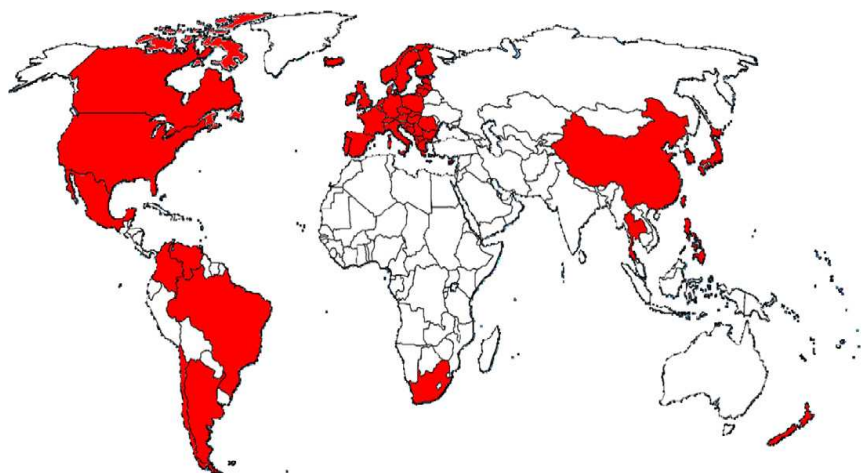


Figura 1- Os países onde foi previamente detectada a SMDS estão identificados a vermelho, adaptado de [1].

1.3.3. Género *Brachyspira*

As bactérias pertencentes ao género *Brachyspira* são bactérias anaeróbicas, gram-negativas, que necessitam de 2-6 dias a 32-42°C para alcançar crescimento visível. Estas

bactérias estão presentes no intestino grosso de várias espécies animais e do homem. A maioria tem entre 6-8µm de comprimento e 0,3-0,4 µm de largura [36].

O género *Brachyspira* é constituído por sete espécies distintas, *B. aalborgi* (descoberta por Hovind-Hougen e colaboradores, 1982), *B. alvinipulli* (descoberta por Swayne e colaboradores, 1995), *B. hyodysenteriae* (descoberta por Taylor and Alexander, 1971), *B. innocens* (descoberta por Stanton, 1992), *B. intermedia* (descoberta por Stanton e colaboradores, 1997), *B. murdochii* (descoberta por Stanton et al., 1997) e *B. pilosicoli* (descoberta por Taylor e colaboradores, 1980) [37].

O género *Brachyspira* é a causa mais comum de diarreia em suínos. As infecções intestinais com espécies *Brachyspira* são responsáveis por grandes perdas económicas, na indústria mundial de suinicultura. A forma de diagnóstico e diferenciação, mais rápida e relativamente barata, das espécies de *Brachyspira*, é a amplificação por PCR a partir de amostras fecais ou de soro de suínos, utilizando *primers* específicos para cada espécie de *Brachyspira*. Embora existam sete espécies desta bactéria apenas duas são consideradas patogénicas em suínos, *Brachyspira hyodysenteriae* e *Brachyspira pilosicoli* [38-40].

A *Brachyspira hyodysenteriae* é considerada a espécie mais patogénica e a causa mais comum de disenteria suína, uma doença intestinal mucohemorrágica grave, que pode ser fatal mesmo após tratamento. A doença provocada por esta espécie aparece com maior frequência em suínos na fase de desmame e engorda, e é transmitida principalmente pela ingestão de material fecal ou pelo contacto com suínos infectados [38, 39, 41].

A *Brachyspira pilosicoli*, tal como a *B. hyodysenteriae*, provoca diarreia intestinal nos suínos e é mais prevalente em animais na fase de desmame. Contudo, esta espécie patogénica provoca um tipo particular de diarreia espiroquetel ou espiroquetose intestinal e crescimento reduzido dos animais infectados [42-44].

A prevenção desta doença pode ser realizada através de boas práticas de higiene das suiniculturas, tais como controlo da qualidade ambiental e hábitos de limpeza entre os diferentes grupos de animais [38-40, 42, 43]. O tratamento da infecção por este género de bactérias é realizado através da administração de antibióticos, por via oral ou injectável. Embora, quando os animais apresentam infecções graves, a via de administração recomendada é a injectável. Os antibióticos mais utilizados e eficazes para o tratamento desta infecção são: Tiamulina, Valnemulina, Lincomicina e Aivlosina [40].

1.3.4. G nero *Chlamydia*

A *Chlamydia*   uma bactéria gram-negativa intracelular obrigatória pertencente à família *Chlamydiaceae* e ordem *Chlamidiales*. Encontra-se distribuída pela natureza, podendo aparecer tanto em animais de sangue frio como em animais de sangue quente, incluindo seres humanos [3, 24, 45-48]. A gravidade da infecção por *Chlamydia* depende tanto da quantidade/patogenecidade do agente infeccioso como do estado imunológico e idade do hospedeiro [45].

Em 1999, Everett, devido às características únicas dos genes *16S rRNA* e *23S rRNA*, propôs uma mudança na taxonomia do género *Chlamydia*, dividindo-o em dois g neros distintos, *Chlamydia* e *Chlamydofila* (Tabela 3). Posteriormente, o mesmo autor, propôs a regresso ao modelo taxon mico anterior, após a análise comparativa dos genomas das duas estirpes que demonstrou que ambas, estavam relacionadas biologicamente e ecologicamente (Tabela 3) [3, 24, 47].

Tabela 3-Taxonomia das bactérias *Chlamydia*, adaptado de [3].

<i>Chlamydial taxonomy before 1999</i>		<i>Chlamydial taxonomy since 1999 (Everett et al., 1999 [22])</i>		<i>Chlamydial taxonomy used in the Twenty-first century (Stephens et al., 2009 [23])</i>	
Order	Chlamydiales	Chlamydiales		Chlamydiales	
Family	Chlamydiaceae	Chlamydiaceae, Simkaniaceae, Parachlamydiaceae, Waddliaceae		Chlamydiaceae, Simkaniaceae, Parachlamydiaceae, Waddliaceae	
Genus	<i>Chlamydia</i>	<i>Chlamydia</i>	<i>Chlamydofila</i>	<i>Chlamydia</i>	
Species	<i>C. trachomatis</i>	Trachoma biovar	<i>C. trachomatis</i>	Trachoma biovar	<i>C. trachomatis</i>
		LGV biovar		LGV biovar	
		Murine biovar	<i>C. muridarum</i>		<i>C. muridarum</i>
		Porcine biovar	<i>C. suis</i>		<i>C. suis</i>
	<i>C. pneumonia</i>	Human biovar		<i>Cp. pneumonia</i>	Human biovar
		Koala biovar			Koala biovar
		Equine biovar			Equine biovar
	<i>C. psittaci</i>	Avian subtype	<i>Cp. psittaci</i>		<i>C. psittaci</i>
		Abortion subtype	<i>Cp. abortus</i>		<i>C. abortus</i>
		Feline subtype	<i>Cp. felis</i>		<i>C. felis</i>
		Guinea-pig subtype	<i>Cp. caviae</i>		<i>C. caviae</i>
	<i>C. pecorum</i>		<i>Cp. pecorum</i>		<i>C. pecorum</i>

T m sido pesquisadas várias esp cies de *Chlamydia* em suínos *Chlamydia suis*, *Chlamydia psittaci*, *Chlamydia abortus* e *Chlamydia pecorum*, associadas a várias desordens clínicas (nomeadamente, doenças respiratórias, conjuntivite, pericardite, enterite, abortos e distúrbios reprodutivos) [3, 45, 48, 49].

O tratamento das infecções por *Chlamydia* pode ser realizado recorrendo a antibióticos como as Tetraciclina (Clortetraciclina, Oxitetraciclina, Doxiciclina) ou recorrendo a estirpes probióticas. Em 2005, Pollman e colaboradores, demonstraram o efeito benéfico de uma estirpe probiótica de *Enterococcus faecium* (NCIMB 10415) sobre a redução de infecções naturais de *Chlamydiaceae* [3, 50]. Quando ocorrem infecções com estirpes muito resistentes, como é o caso da *Chlamydia suis*, podem ainda ser administrados outros tipos de antibióticos como as Quinolonas (Enrofloxacina) e os Macrólidos (Eritromicina) [3, 51, 52].

A limpeza, do equipamento e das instalações dos suínos infectados, é um mecanismo de prevenção/contenção da infecção muito importante. Uma vez que, a família *Chlamydiaceae* pode sobreviver até 30 dias nas fezes e nos materiais de forragem dos estábulos. A desinfecção dos ambientes circundantes dos animais com a maioria dos detergentes e anti-sépticos normais são suficientes para inactivar as espécies da família *Chlamydiaceae* [3, 52].

1.3.5. Género *Leptospira*

A *Leptospira* é uma bactéria helicoidal gram-negativa, com cerca de 0,1 µm de diâmetro por 6-20µm de comprimento, pertencente à família *Leptospiraceae* e ordem *Spirochaetales*. As bactérias deste género são aeróbias obrigatórias e o seu crescimento óptimo ocorre aos 28-30°C. Este grupo de bactérias compreende espécies patogénicas e saprófitas [4, 19, 53]. As espécies patogénicas são: *L. alexanderi*, *L. alstonii*, *L. borgpetersenii*, *L. inadai*, *L. interrogans*, *L. fainei*, *L. kirschneri*, *L. licerasiae*, *L. noguchi*, *L. santarosai*, *L. terpstrae*, *L. weilii*, *L. wolffii*. As espécies saprófitas da *Leptospira* são: *L. biflexa*, *L. meyeri*, *L. yanagawae*, *L. kmetyi*, *L. vanthieli*, *L. wolbachii* [4, 19, 54].

As *Leptospiras* são responsáveis pela maior zoonose associada aos suínos, distribuída mundialmente, a Leptospirose [4, 24, 53, 55-57]. A Leptospirose é uma doença sistémica dos seres humanos e animais domésticos, principalmente cães, bovinos e suínos (Figura 2). Esta doença é caracterizada pelo aparecimento de febre, insuficiência renal, insuficiência hepática, manifestações pulmonares e distúrbios reprodutivos. Tanto nos suínos como nos humanos, os sinais clínicos e a intensidade da doença variam de acordo

com o serótipo responsável pela infecção e com as características do paciente (ex: idade, debilidade, imunidade, etc.) [4, 19, 58].

As *Leptospiras* são agentes etiológicos importantes de transtornos reprodutivos em suínos, e embora possam causar lesões em vários órgãos, localizam-se preferencialmente nos rins onde se multiplicam [4, 24, 57]. Ao serem, excretadas na urina podem contaminar tanto o solo como as águas. A infecção por estas bactérias ocorre directamente, quando existe contacto com a urina contaminada, ou indirectamente, através de água contaminada. As infecções por *Leptospira* podem ser prevenidas não só ao nível da higiene dos estábulos e meios circundantes das explorações, mas sobretudo, ao nível da utilização de águas não infectadas na higiene e alimentação dos animais [4, 19, 58]. Este tipo de doenças pode ser tratado com injeções de penicilina, penicilinas semi-sintéticas e estreptomicina, para animais com infecção aguda [35].

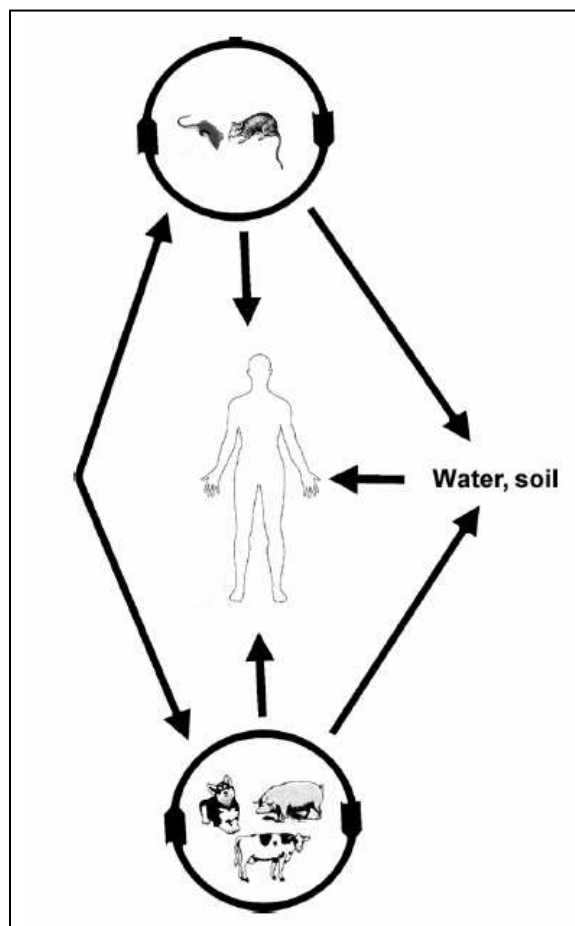


Figura 2-Epidemiologia de Leptospirose em animais e humanos, adaptado de [4].

1.3.6. Género *Salmonella*

A *Salmonella* é uma bactéria gram-negativa, anaeróbica facultativa, em forma de bastonete, pertence à família *Enterobacteriaceae* e tem como habitat principal o trato digestivo dos animais [59, 60]. O género *Salmonella* é reconhecido como sendo um importante agente infeccioso associado a animais podendo ser detectado em alimentos de origem animal. Existem várias espécies dentro deste género, sendo a *S. typhimurium* a espécie mais frequente em suínos [24, 61-64]. Este género de bactérias normalmente são simbióticas, contudo, quando eliminadas nas fezes representam uma importante fonte de contaminação para o meio ambiente. Os suínos contaminados com a bactéria, mesmo não apresentando sintomas de infecção, podem transmitir a bactéria aos seres humanos através da cadeia alimentar [24, 60, 62, 63].

A transmissão de *Salmonella* ocorre segundo múltiplas formas de introdução desta bactéria no ecossistema da exploração, no entanto, a transmissão é normalmente confinada às explorações. Para evitar a contaminação de animais saudáveis, devem-se criar barreiras, entre estes animais e os animais contaminados, colocando-os em espaços distintos. São exemplo de prevenção, a criação de diferentes espaços para as diferentes fases de produção suinícola (gestação, maternidade, recria e engorda). O acautelar de certas condições ambientais, propícias ao desenvolvimento desta bactéria (temperatura, luminosidade e humidade) são importantes factores de prevenção e controlo deste tipo de microorganismo [65-68]. As infecções provocadas por espécies do género *Salmonella* podem ser tratadas através da administração correcta de antibióticos como, Tetraciclina, Estreptomicina, Apramicina, Neomicina, Ampicilina, Amoxicilina, entre outros [35]. No entanto, segundo estudos realizados, a *Salmonella typhimurium* pode apresentar multirresistência a alguns destes antibióticos, sendo o seu tratamento realizado com recurso a outro tipo de fármacos [69].

1.3.7. *Haemophilus parasuis*

Haemophilus parasuis é uma pequena bactéria gram-negativa em forma de bacilo, pleomórfica, imóvel, pertencente à família *Pasteurellaceae*, que normalmente coloniza o trato respiratório superior dos suínos [70, 71]. O *Haemophilus parasuis* é o agente etiológico da doença de Glasser (Tabela 4), patologia sistémica grave, que é caracterizada

por poliserosite fibrinosa, poliartrite, edema nas articulações e meningite, por vezes, também é responsável por outros casos clínicos como pneumonias e mortes súbitas [71, 72]. Inicialmente, a caracterização bioquímica deste agente etiológico era confundida com a do *Haemophilus suis*, bactéria que exige os factores de crescimento X (porfirina de ferro) e V (NAD- Dinucleotídeo Nicotinamida e Adenina). No entanto, Biberstein e Branco em 1969 demonstraram que a bactéria *Haemophilus parasuis* era uma bactéria distinta pois apenas dependia do factor V (NAD) para o seu crescimento [73].

Esta bactéria produz frequentemente septicémia aguda e a sua endotoxina induz a coagulação intravascular disseminada, resultando na formação de microtrombos em vários órgãos [71]. Contudo, a doença de Glasser pode ser tratada com antibióticos, sendo necessária a administração de elevada dosagem para o tratamento da doença [71, 73]. São exemplos deste tratamento, as injeções de penicilina, penicilinas sintéticas, ampicilina ou amoxilina e oxitetraciclina [35, 73, 74]. Tal como nos outros agentes infecciosos, a higiene do animal e da exploração são factores preponderantes para a prevenção desta doença. Sendo a desinfecção dos ambientes circundantes dos animais suficiente para inactivar as espécies desta família [71].

Tabela 4- Espécies de *Haemophilus* estudadas em animais, adaptado de [19].

Hospedeiro	Espécie	Habitat normal	Doença Associada
Suíños	<i>Haemophilus parasuis</i>	Tracto Respiratório Superior	Doença de Glasser, septicemia, artrite
Aves domésticas	<i>Avibacterium paragallinarum</i>	Tracto Respiratório Superior	Infecção respiratória
Gatos	<i>H. felis</i>	Tracto Respiratório Superior	Infecção respiratória superior
Cães	<i>Haemophilus haemoglobinophilus</i>	Tracto genital	Nados Mortos
Bovinos, Ovinos	<i>Histophilus somni</i>	Tracto Respiratório e Genital	Pneumonias, falhas reprodutivas, entre outras
Cavalos	<i>Taylorella (H.) equigenitalis</i>	Tracto Genital	Aborto e infertilidade

1.3.8. *Influenza A*

Influenza é um vírus que pertence ao género *Orthomyxovirus* da família *Orthomyxoviridae* e possui uma única molécula de RNA de *sense* negativo com um genoma que contém oito genes que codificam para oito proteínas. As principais glicoproteínas são a hemaglutinina e a neuraminidase, possuem invólucro viral e funcionam como antígenos chave contra os quais a resposta imune é dirigida [75]. O vírus *Influenza* é o agente infeccioso responsável pela gripe na maioria dos animais, e também nos suínos [76]. A *Influenza* suína foi observada pela primeira vez em 1918 nos EUA, Hungria e China. Esta descoberta, coincidiu com uma pandemia de gripe “espanhola”, responsável pela morte de cerca de 20 milhões de pessoas a nível mundial. Contudo apenas em 1930, o vírus da gripe clássica (H1N1) foi isolado em porcos. Durante vários anos, a estirpe H1N1 foi considerada a única linhagem de gripe na população suína. Porém, a partir de 1998 surgiram novos subtipos do vírus *Influenza* em suínos, nomeadamente, as estirpes H3N2, H5N1 e H1N2 [17, 77].

O vírus *Influenza* infecta uma grande variedade de espécies, incluindo seres humanos, porcos, cavalos, mamíferos marinhos e aves [78]. Segundo estudos realizados, a transmissão do vírus da gripe pode ser realizada entre espécies distintas, tanto entre porcos e humanos como entre estes e as aves (Fig.3) [77]. Devido à interacção mundial entre as diferentes espécies, existe elevado potencial de transmissão do vírus da gripe na natureza [78]. Assim, além do impacto económico existe o risco para a saúde pública, representado pela manutenção, evolução e emergência do vírus *Influenza* em suínos. É de salientar que os suínos são um importante hospedeiro na ecologia do vírus, uma vez que são susceptíveis à infecção com os diferentes subtipos evidenciados anteriormente. A natureza e gravidade da infecção, pelo vírus da gripe suína, dependem tanto da estirpe do vírus como da idade e estado imunológico do hospedeiro [79].

A infecção pelo vírus da gripe suína manifesta-se através de doença respiratória aguda, febre, anorexia, perda de peso, letargia, secreção nasal e ocular, tosse e dispneia [17, 80]. A medida de prevenção mais eficaz contra a infecção provocada por este vírus é a vacinação das porcas, protegendo assim os leitões através dos anticorpos maternos, contudo não é totalmente eficiente [77].

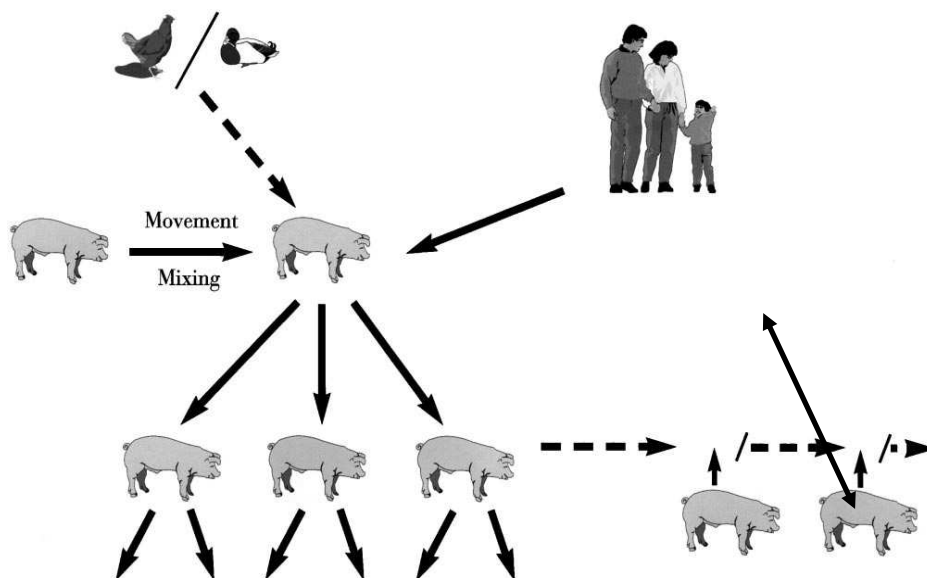


Figura 3- Origem e transmissão do vírus *Influenza*, adaptado de [78].

1.3.9. *Lawsonia intracellularis*

A *Lawsonia intracellularis* pertence à subdivisão *Delta* da classe *Proteobactéria*, da família *Desulfovibrionaceae* e é a espécie do género *Lawsonia* mais frequente nos suínos [19, 81, 82]. A *Lawsonia intracellularis* é uma bactéria intracelular obrigatória, gram-negativa, não flagelada, não esporulada e microaerófila. Esta bactéria causa Enteropatia Proliferativa, ou ileíte, em suínos, esta é uma doença entérica transmissível que afecta principalmente animais em fase de crescimento ou em final de vida [83-85]. A Enteropatia Proliferativa é também uma doença conhecida por provocar hiperplasia da mucosa ileal e do cólon em suínos. A infecção tem duas manifestações clínicas: a adenomatose intestinal suína (ou PIA) e a enteropatia hemorrágica proliferativa (ou PHE) [83, 85, 86].

As infecções por *L. intracellularis* têm uma distribuição uniforme por todos os continentes, principalmente, em regiões produtoras de suínos (quer em explorações suinícolas quer em recintos ao ar livre) [86, 87]. O tratamento destas doenças pode ser realizado recorrendo a antibióticos (macrólidos, tetraciclins, etc), contudo, a prevenção através da higiene dos pavilhões e meios circundantes é a forma mais eficaz de combate a estas patologias [88, 89].

1.3.10. *Mycoplasma hyopneumoniae*

Mycoplasma hyopneumoniae é uma bactéria que pertence à classe dos *Mollicutes* sendo das bactérias mais pequenas da natureza [90]. Este tipo de bactéria não apresenta parede celular e o seu DNA circular de cadeia dupla contém apenas 1.140Kb. O *M. hyopneumoniae* é o agente primário da pneumonia enzoótica suína, também chamada de pneumonia micoplasmática suína. A pneumonia enzoótica suína é uma doença respiratória crónica, muito contagiosa que causa grandes perdas económicas na indústria suinícola [24, 91-93]. A infecção por esta bactéria ocorre pelo contacto directo com animais portadores da doença, com secreções respiratórias ou com o ar contaminado. As fêmeas em fase de aleitamento são consideradas uma das fontes principais de transmissão deste tipo de infecção [24, 94]. Os sintomas desta doença são tosse seca, febre, atraso no crescimento e anorexia [95, 96].

O *M. hyopneumoniae* é uma bactéria que prolifera rapidamente em condições ambientais favoráveis para o seu crescimento sendo assim um agente infeccioso muito difícil de controlar. A proliferação desta bactéria pode ser controlada através de boas condições de higiene e desinfecção dos pavilhões dos animais ou ainda através do isolamento dos animais contaminados. O tratamento dos animais contaminados, por esta bactéria, pode ser efectuado recorrendo a antibióticos do tipo, Valnemulina, Tiamulina, Lincomicina, Enrofloxacina, Ciniazol ou outros antibióticos macrólidos [35, 94].

1.3.11. *Pasteurella multocida*

As bactérias do género *Pasteurella* são anaeróbicas facultativas, gram-negativas, imóveis, pleomórficas e pertencem à família *Pasteurellaceae* [97]. A maioria das espécies *Pasteurella* colonizam simbioticamente as membranas mucosas dos animais, estando geralmente ausentes no ser humano. Contudo, a espécie *Pasteurella multocida* é responsável por doenças em animais de exploração em países desenvolvidos e em desenvolvimento [97-99].

As principais doenças pelas quais a *Pasteurella multocida* é responsável são: rinite atrófica progressiva suína e septicemia hemorrágica bovina [98]. A rinite atrófica progressiva suína é uma doença grave, caracterizada pelo atraso no crescimento, epístaxis (hemorragia nasal) e posterior deformação do focinho do animal [100, 101]. As estirpes toxigénicas (tipos A e D) da *Pasteurella multocida* estão frequentemente associadas a esta

doença. A *Pasteurella multocida* também tem um papel importante no aumento da gravidade das lesões pulmonares em suínos contaminados [102]. O controlo das infecções provocadas por *Pasteurella multocida*, tanto em suínos como em humanos, é feito com vários tipos de antibióticos como: Penicilinas; Oxitetraciclinas; Sulfonamidas e Sulfametazina, Tabela 5 [74, 103, 104].

Tabela 5- Algumas vacinas utilizadas no tratamento de *Pasteurella multocida*, adaptado de [74].

Vacina	Agente Infeccioso
Porcilis AR-T	<i>P.multocida</i> e <i>Bordetella bronchiseptica</i>
Suvaxyn AR (DNT)	<i>P.multocida</i> e <i>Bordetella bronchiseptica</i>
Suipravac RC	<i>P.multocida</i> e <i>E.coli</i>
Rinipravac-DT	<i>P.multocida</i> e <i>Bordetella bronchiseptica</i>
Rhiniffa T	<i>P.multocida</i> e <i>Bordetella bronchiseptica</i>
Rhinanvac	<i>P.multocida</i> , <i>Bordetella bronchiseptica</i> , <i>P.haemolytica</i> , <i>M. hyopneumoniae</i>
Ingelvac dart	<i>P.multocida</i> e <i>Bordetella bronchiseptica</i>

A prevenção, das infecções provocadas por este agente, resume-se ao estabelecimento de boas práticas de desinfecção e controlo ambiental das explorações. O isolamento dos animais contaminados também é um factor preponderante para o controlo e prevenção desta doença [9, 103].

1.3.12. Vírus PRRS – Síndrome Reprodutiva Respiratória em Suínos

O vírus da Síndrome Reprodutiva Respiratória em Suínos (PRRS) é uma ameaça para a produção de suínos em todo mundo, uma vez que afecta tanto o sistema respiratório como o sistema reprodutivo [105]. O agente etiológico de PRRS é um vírus encapsulado de RNA com cadeia simples *sense* positiva [106], que pertence à ordem *Nidovirales*, família *Arteriviridae* e género *Arterivirus* [107]. O genoma de 15kb compreende duas ORFs, a ORF1a e a ORF1b, que compõe 75% do genoma viral e são traduzidas e transformadas em 14 proteínas não estruturais, necessárias para a replicação viral, que apresentam actividade replicase, protease e polimerase [108].

A doença causada pelo vírus PRRS foi observada pela primeira vez nos Estados Unidos em 1987, alguns anos mais tarde, 1990, foi detectada na Europa e actualmente está

presente em todo o mundo. O vírus foi isolado pela primeira vez em 1991 na Holanda (Lelysatd Virus-LV) e posteriormente, nos Estados Unidos (estirpe VR-2332). A tipagem genética usando as sequências de nucleótidos da ORF5, que codifica glicoproteínas da superfície principal do vírus, permite distinguir o genótipo da União Europeia (EU, Tipo1) do genótipo da América do Norte (NA, Tipo 2). Os genótipos isolados do vírus apresentam características genéticas muito diversas. Esta heterogeneidade do genoma viral, representa um grande obstáculo para o controlo e prevenção do vírus *PRRS* [108].

O género *Suis* é o único hospedeiro conhecido, até à data, deste tipo de vírus. Os sintomas provocados pela *Síndrome Reprodutiva Respiratória em Suínos* variam nos diferentes estádios de desenvolvimento dos animais (Tabela 6) [105]. O vírus da *PRRS* propaga-se facilmente após contacto directo, tanto através de sêmen contaminado, quer por fecundação natural quer por inseminação artificial, como através de mucosidades nasais infectadas. A transmissão do vírus pode ocorrer também de forma indirecta, através de equipamento contaminado (agulhas; equipamento de trabalho; veículos de transporte) e ainda através de picadas de insectos [105, 106].

Tabela 6 - Sintomas da *PRRS* nos diferentes estádios de desenvolvimento dos suínos, adaptado de [105].

Suínos adultos	Crias afectadas	Suínos desmamados
Redução de apetite	Suínos nascidos mortos	Perda de apetite e letargia
Febre	Alta mortalidade pré-desmame	Fracasso óbvio
Aborto e parto prematuro	Suínos definhados	Respiração difícil ou rápida e/ou dificuldade respiratória
Causa a morte a 10% ou mais de porcas	São poucas as crias que resistem	Vermelhidão na pele
Perda de equilíbrio	Edema em redor dos olhos	Pelagem áspera

O vírus pode espalhar-se facilmente por regiões onde exista produção intensiva de suínos, nomeadamente zonas com explorações vizinhas infectadas. A aquisição de animais e sémen contaminados com o vírus são outros factores de risco muito importantes para a propagação desta doença [106]. Para controlar a propagação do vírus são recomendados quer o uso de vacinas quer o controlo da entrada e saída de animais de risco. A boa gestão do ambiente e higiene das explorações também podem ser um bom método de prevenção e controlo deste tipo de infecção [35, 106].

1.4. Técnicas de Diagnóstico de Agentes infecciosos

Os métodos microbiológicos tradicionais de identificação de vírus e bactérias, causadores de doenças em suínos, são pouco eficientes. Deste modo, existe a necessidade de desenvolvimento de métodos inovadores e eficazes, para a rápida identificação destes agentes infecciosos. Os recentes avanços da biologia molecular, nomeadamente, das técnicas de manipulação de ácidos nucleicos, têm revolucionado a detecção de vírus e bactérias nos mais diversos tipos amostrais (ex.: alimentos, águas, animais, etc.) [109]. O diagnóstico de doenças infecciosas exige uma abordagem estratégica, uma vez que, o agente etiológico pode ter origem tanto em bactérias como em vírus. Este tipo de doenças pode ainda apresentar sintomas idênticos o que dificulta ainda mais a sua identificação. A intervenção eficaz numa doença infecciosa depende da identificação atempada e rigorosa dos agentes infecciosos causadores da doença [16].

O diagnóstico microbiano convencional utiliza técnicas de microscopia e cultura celular. Este processo torna-se demorado devido ao crescimento lento de alguns agentes infecciosos e à impossibilidade de cultura de outros. Assim, os resultados poderão demorar várias semanas o que limita o valor das informações obtidas no diagnóstico. Apesar da microbiologia convencional ser um método com custos pouco significativos, embora dependa da interpretação de técnicos especializados, o tempo de resposta destes é bastante prolongado. Esta demora é sem dúvida uma grande desvantagem uma vez que o factor tempo é muito importante para a intervenção atempada do veterinário [16].

A detecção de agentes infecciosos também pode ser baseada em métodos sorológicos. Estes métodos podem ser realizados por diferentes técnicas como ELISA e aglutinação. As análises sorológicas baseiam-se no princípio reactivo antigénio/anticorpo

ou anticorpo/anticorpo. Estas reacções pressupõem que a existência de reactividade é correspondente à contaminação do animal por um determinado agente infeccioso. No entanto, é necessário ter em consideração que o animal pode produzir determinados anticorpos apenas porque esteve em contacto com determinada bactéria/vírus e não por estar contaminado. Isto é, um animal pode não ter a infecção activa e ter os valores de anticorpos elevados para um determinado agente infeccioso. Estes resultados são bastante comuns após vacinação dos animais. Apesar dos métodos sorológicos serem bastante rápidos e pouco dispendiosos, a baixa especificidade para o agente infeccioso é sem dúvida uma grande desvantagem em relação aos outros métodos de diagnóstico [16, 110].

Recentemente, os métodos sorológicos têm vindo a ser substituídos por técnicas de diagnóstico molecular. As técnicas de diagnóstico molecular permitem a análise qualitativa e quantitativa dos diferentes organismos, pela selecção de sequências alvo específicas [16, 111]. A PCR (Reacção em Cadeia da Polimerase) é, sem dúvida, a técnica molecular mais utilizada na detecção de agentes infecciosos em todo o mundo. Nalguns laboratórios, esta técnica veio mesmo substituir por completo as técnicas tradicionais de diagnóstico devido à sua robustez e fiabilidade. Apesar de ser um método relativamente dispendioso, a PCR tem inúmeras vantagens em relação aos outros métodos, nomeadamente no que diz respeito à sensibilidade, especificidade e rapidez de diagnóstico [111, 112].

1.4.1. Diagnóstico molecular de agentes infecciosos

As técnicas moleculares, baseadas nos ácidos nucleicos, são cada vez mais uma ferramenta incontornável na detecção e identificação de agentes infecciosos. A utilidade dos testes baseados em DNA/RNA depende da qualidade e natureza da amostra utilizada para diagnóstico. Actualmente existe uma variedade enorme de métodos para extracção e análise de ácidos nucleicos [2, 113]. A escolha da amostra biológica e do método de extracção é definida consoante o ensaio clínico/diagnóstico pretendido. Desta forma, cada método laboratorial apresenta o seu potencial em relação à garantia de qualidade das amostras. Sendo que, algumas técnicas moleculares exigem ácidos nucleicos íntegros, (ex: Southern blots, electroforese em gel de campo pulsado, etc.) enquanto outras geralmente são menos exigentes em relação ao tamanho e integridade dos ácidos nucleicos (ex: PCR, análise de fragmentos, etc). Para além da integridade, também a qualidade, pureza e

concentração das amostras são factores a ter em consideração. Estes podem ser optimizados com a selecção cuidadosa da origem da amostra e técnica de extracção [2].

A tipagem molecular do DNA/RNA dos agentes infecciosos foi introduzida com sucesso durante a década de 1990 [114]. Durante esta década, desenvolveram-se técnicas moleculares com capacidade de discriminar os genomas microbianos e virais de forma a identificar a sua taxonomia. Os estudos de mecanismos evolutivos, as relações filogenéticas, a genética de populações destes agentes, foram essenciais para o conhecimento da epidemiologia de muitas doenças infecciosas [115]. Na avaliação dos sistemas de tipagem molecular devem ser considerados vários parâmetros como: a reprodutibilidade; a estabilidade; e o poder discriminatório do sistema. Os sistemas de tipagem podem ser classificados em fenotipagem e genotipagem. Os fenotípicos são aqueles que detectam características expressas por microrganismos (fenotipagem). Os genotípicos dizem respeito à análise directa de ácidos nucleicos e detectam características específicas de cada genoma microbiano (genotipagem). Cada um destes processos tem utilidades específicas de diagnóstico, o primeiro serve sobretudo para a identificação do agente envolvido na infecção, o segundo é mais utilizado para a identificação da estirpe predominante em cada tipo de infecção [20].

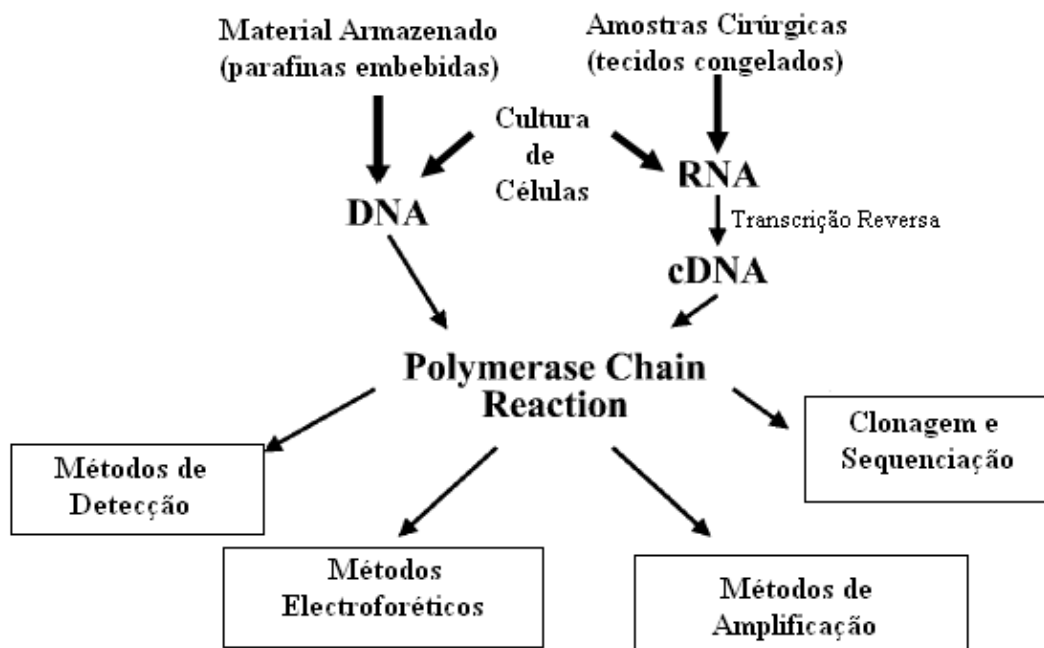


Figura 4 – Representação esquemática das fontes de ácidos nucleicos para a reacção de PCR e dos métodos para qual a PCR pode servir, adaptado de [2].

A detecção rápida e confiável de agentes patogénicos é essencial para a gestão das doenças que ameaçam a competitividade económica da indústria suinícola e consequentemente a indústria alimentar mundial [31]. Entre as técnicas moleculares existentes, a reacção em cadeia da polimerase (PCR) é actualmente a mais utilizada pela sua grande fiabilidade e versatilidade. [2]. A PCR é base para inúmeras técnicas moleculares, tornando-se uma técnica essencial para laboratórios de pesquisa básica bem como para laboratórios de diagnóstico clínico [31].

1.4.2. Detecção de agentes infecciosos por PCR

O conceito PCR foi descrito pela primeira vez em 1985 e a técnica moderna surgiu alguns anos depois. Desde essa data, a técnica tem vindo a ser cada vez mais um método indispensável nos laboratórios de análises em todo o mundo. A característica mais importante da PCR é a capacidade de amplificar exponencialmente cópias de DNA/cDNA a partir de uma quantidade mínima de material biológico (Figura 4) [116].

A PCR consiste na síntese enzimática *in vitro* de cópias de DNA/cDNA a partir de uma sequência alvo. A especificidade do teste é obtida a partir da utilização de sequências complementares à específica do agente infeccioso. Numa reacção normal de PCR utilizam-se os seguintes produtos: DNA-Polimerase termoestável (ex: *Taq polimerase*); um par de *primers* específicos para o agente infeccioso (*primer forward* e *primer reverse*); mistura de Desoxirribonucleotídeos (dNTPs: dATP; dTTP; dCTP; dGTP); tampão da polimerase; e DNA molde [2]. A técnica de PCR, se for concebida adequadamente, apresenta níveis excelentes de especificidade/sensibilidade para a detecção de todo o tipo de agentes infecciosos. A variabilidade da amostra, que serve de base para a PCR, é imensa desde amostras de fezes a amostras de tecidos. Apesar de alguns autores fazerem referência a inibidores da PCR, que reduzem a eficácia do ensaio, hoje em dia é perfeitamente contornável através das técnicas de extracção. A PCR é uma técnica rápida, sensível, específica e fiável para a detecção de agentes patogénicos [24, 60, 62]. A sensibilidade e especificidade da PCR também variam de acordo com a preparação da amostra, sendo bastante comuns contaminações [3, 47]. A tipagem por PCR é um método de diagnóstico simples que pode ser usado para a fenotipagem ou genotipagem de agentes infecciosos. As principais limitações deste método são: o conhecimento prévio da sequência alvo; a utilização de *primers* específicos em grandes quantidades; e a requisição de elevada

qualidade da amostra biológica (não devendo apresentar degradação dos ácidos nucleicos nem contaminações) [2].

Uma reacção de PCR consiste numa série de ciclos, cada um dos quais envolve reacções efectuadas a temperaturas diferentes. Cada ciclo de PCR é constituído por três fases distintas: desnaturação do DNA molde (a 95°C), emparelhamento dos *primers* (a 55°-65°C) e a síntese do DNA (a 72°C). A desnaturação consiste na separação das cadeias da dupla hélice de DNA através do calor. Esta separação é essencial para que na segunda fase os dois *primers* se liguem às sequências dos pares de bases complementares da cadeia molde. A temperatura desta fase varia, dependendo da composição do *primer* e da sua complementaridade com o DNA alvo. Os *primers* servem, portanto, de ponto de partida para a replicação de DNA e para a extensão. A enzima responsável por esta polimerização é a DNA polimerase termoestável. É essencial que a enzima usada seja estável ao calor, uma vez que os ciclos de PCR têm lugar a temperaturas situadas entre os 55°C e 95°C. Para executar este ciclo usa-se um termociclador, Figura 5, que faz variar de forma rigorosa o tempo e a temperatura ao longo do ciclo. Normalmente, são repetidos cerca de 30 a 40 ciclos, o que demora apenas algumas horas. Assim, duas novas cadeias são sintetizadas a partir da cadeia molde em cada ciclo completo de PCR, logo ocorre um crescimento exponencial, havendo ao fim de n ciclos 2^n vezes mais cópias do que no início [117].



Figura 5 – Termociclador MyCycler da Biorad.

Uma série de factores podem ter impacto significativo sobre a eficiência e a especificidade da PCR, incluindo: o desenho de *primers*, os parâmetros de PCR (número de ciclos, tempos e temperaturas dos ciclos) e a composição da mistura de PCR. O desenho cuidadoso dos *primers* é necessário para se obter os produtos desejados em grande quantidade, para suprimir a amplificação de sequências não requeridas e para facilitar a

consequente manipulação dos produtos amplificados. Uma vez que a reacção de PCR é capaz de amplificar milhões de vezes uma única molécula de DNA, devem ser tomadas precauções para evitar contaminações da amostra com DNA exógeno [118].

Na maioria das aplicações de PCR, o parâmetro mais crítico é a temperatura de emparelhamento dos *primers* utilizados. Se a temperatura é muito elevada, muito próxima ou superior à T_m (temperatura de fusão ou de *melting*) dos *primers*, estes ligam-se mal ou não se ligam e a amplificação é muito baixa ou inexistente. Se a temperatura é muito baixa, pode ocorrer uma ligação inespecífica dos *primers*, resultando na amplificação de fragmentos não pretendidos. Pode-se melhorar a especificidade do PCR alterando a temperatura de hibridação dos *primers* em gradientes controlados de temperatura (alterações sucessivas de 0,5-1°C). A temperatura máxima de emparelhamento é determinada pela T_m do *primer* [2].

Para além da temperatura de emparelhamento, também o magnésio (Mg^{2+}) influencia a performance da PCR. Todas as DNA polimerases termoestáveis requerem para a sua actividade catiões divalentes livres (ex: Mg^{2+}). O excesso deste composto leva ao aumento de ligações inespecíficas dos *primers*, resultando na amplificação de fragmentos não pretendidos. Por outro lado a baixa concentração de Mg^{2+} está associada a fracas amplificações ou mesmo inexistentes. A concentração óptima de Mg^{2+} deve ser determinada empiricamente para cada combinação de *primers* e cadeia de DNA, uma vez que esta depende destes dois intervenientes [2].

Apesar das vantagens de sensibilidade, velocidade e especificidade, existem alguns factores que podem afectar significativamente a técnica PCR. Desde o início da utilização da PCR no diagnóstico de doenças, um problema para os laboratórios tem sido a elevada sensibilidade da reacção. Esta sensibilidade muitas vezes leva a falsos positivos. Normalmente, a causa de falsos positivos é a contaminação das reacções teste de PCR com produtos de reacções anteriores. Actualmente, a maioria dos laboratórios de diagnóstico usa protocolos para minimizar a possibilidade de contaminação. Estes incluem separar fisicamente as áreas onde as reacções são preparadas e incluir controlos negativos na análise (ex: água) [2].

O conhecimento prévio das sequências genéticas dos agentes infecciosos é outro dos requisitos fundamentais para o sucesso da tipagem molecular por PCR. Cada organismo

biológico apresenta zonas específicas que permitem distingui-los dos restantes organismos. Dependendo do tipo de diagnóstico pretendido, a selecção do gene ou zona do gene que vai servir de molde varia. Na detecção por PCR de géneros como a *Chlamydia* em suínos os genes *ompA*, *16S-23S rRNA* ou *inc A* são os mais referenciados. Contudo, o gene *16S rRNA* parece ser o mais indicado para a detecção deste tipo de bactérias [24, 47, 49, 52]. Normalmente, nesta bactéria, estão presentes múltiplas cópias dos genes *16S rRNA*, aumentando assim a sensibilidade da técnica de PCR [3, 47]. Segundo vários autores, um dos poucos genes de *H. parasuis* previamente sequenciados foi o gene *16S rRNA*. Este gene pode ser utilizado para a identificação desta espécie e permite diferenciar o *H. parasuis* de outros organismos NAD-dependentes da família *Pasteurellaceae* isolados em suínos [119-122]. O diagnóstico de *Lawsonia* é geralmente baseado na técnica de PCR, com *primers* criados a partir do *pCL078* que permite a amplificação de regiões conservadas do gene *16S rRNA* [82, 86]. Contudo, na detecção da espécie *Lawsonia intracellularis* o gene *CRS* é o mais referenciado, uma vez que permite diferenciar esta espécie das restantes deste género [82, 86]. No caso do género *Salmonella*, apesar de também ser utilizado o gene *16S rRNA*, alguns autores defendem que a *random sequence* é a zona mais indicada para a detecção e discriminação destas bactérias [123]. A técnica de PCR tem sido muito útil para o diagnóstico de bactérias do género *Brachyspira*. Para o diagnóstico de *B. hyodysenteriae* os investigadores têm-se baseado nos genes *16S rRNA*, *23S rRNA*, *NADH oxidase (nox)*, *hemolisina (tly)* e *flaB1*. Sendo que, o gene *flaB1* parece ter maiores vantagens na detecção/identificação desta bactéria [38, 124, 125]. Na detecção de *Pasteurella multocida*, são utilizados vários genes sendo o gene *KMT1* um dos mais utilizados na sua identificação [98, 101, 102]. O género *Leptospira* é detectado a partir da sequência específica do gene *SecY* ou do gene *LipL32* [54, 57]. A virulência/infecção por *Actinobacillus pleuropneumoniae* é influenciada por polissacarídeos capsulares, lipopolissacarídeos, proteínas da membrana, factores de adesão e exotoxinas. Deste modo, os sistemas de tipagem molecular, para identificação deste género de bactérias baseiam-se nos genes *apx* e *omlA* [126, 127]. Contudo, segundo estudos anteriores o gene *omlA* tem-se mostrado o mais adequado para esta espécie de *Actinobacillus* [126-128]. Na detecção de *PCV2*, são utilizados vários genes, sendo o gene *replicase protein*, um dos mais utilizados na sua identificação [129-131]. O *Mycoplasma hyopneumoniae* também pode ser identificado por PCR sendo o gene *mhp protein*, o gene referência para esta bactéria [132-

134]. Na detecção do vírus *PRRS* por PCR podem ser consideradas várias ORFs, no entanto segundo estudos realizados a ORF mais eficiente é a ORF7 [135-137]. Finalmente, na detecção do vírus *Influenza A* por PCR, embora hajam muitas alternativas, o gene alvo preferencial tem sido o gene *segment 7* (que codifica 2 proteínas da matriz M1 e M2) [77, 138-140].

2. Objectivos

Este trabalho teve como objectivo principal a optimização de técnicas de tipagem molecular por PCR de bactérias e vírus patogénicos, responsáveis por infecções/doenças epidémicas de suínos. Secundariamente procedeu-se à análise e determinação de frequências de infecção dos diferentes vírus e bactérias, a partir de amostras biológicas de soro de suínos. Finalmente, este estudo tentou determinar a prevalência dos diferentes agentes infecciosos e doenças associadas nos animais analisados.

3. Material e Métodos

3.1. Amostragem

Neste estudo utilizaram-se 100 amostras de soro de suínos, provenientes de diferentes explorações. As amostras foram colhidas para tubos de 10 ml contendo 1 ml de uma solução de 5% de EDTA- Na_2 (Boehringer Mannheim, Alemanha). O sexo e a idade dos animais não foram relevantes neste estudo, sabendo-se apenas que existem espécimes dos dois sexos (machos e fêmeas) e que as idades variam desde os primeiros dias de vida até à fase terminal. As amostras utilizadas para este estudo foram gentilmente cedidas pela Unidade Biofairway do Biocant Park, estas são amostras de rotina enviadas para o laboratório para despistagem de agentes infecciosos, isto é, amostras para monitorização e detecção de doença (com e sem suspeita de infecção), provenientes de várias suiniculturas da zona centro do país.

3.2. Isolamento do soro

As amostras de sangue, colhidas para tubos de 10 ml com EDTA, foram centrifugadas a 800 g durante 10 minutos (centrifuga, Jouan, MR22i, UK). Com a centrifugação obteve-se a separação do soro dos restantes constituintes do sangue (glóbulos brancos e vermelhos). O soro foi transferido para tubos de 1,5 ml (Eppendorfs, UK).

3.3. Extracção de DNA

A extracção de DNA foi realizada, a partir do soro previamente separado, com recurso a um kit comercial QIAamp® DNA Blood Mini Kit (QIAGEN, California-EUA), utilizando o protocolo “DNA purification from Body fluids”. Para extrair DNA a partir de bactérias ou vírus, é necessário romper as membranas celulares e nucleares. Pipetou-se 20 µl de QIAamp® proteinase K para tubos de 1,5 ml, de seguida adicionou-se 200 µl da amostra de soro. Para assegurar uma lise eficaz adicionou-se 200 µl de Tampão de lise QIAamp® AL à amostra e agitou-se no vortex durante 15 segundos. De seguida incubou-se as misturas a 56°C durante 10 minutos. Nesta fase o DNA atinge o máximo de rendimento após a lise celular. Seguidamente, adicionou-se 200 µl de etanol absoluto (Merck, Darmstad, Alemanha) misturou-se novamente e centrifugaram-se brevemente os tubos. A etapa seguinte foi passar a mistura dos tubos para colunas QIAamp® Mini Spin. Fechou-se as tampas e centrifugou-se a 6000 g durante 1 minuto. De seguida passou-se cada amostra por uma coluna QIAamp® Mini Spin para um tubo novo de 2 ml e descartou-se os outros tubos que continham o filtrado. Abriu-se cuidadosamente as colunas e adicionou-se 500 µl de Tampão de lavagem QIAamp® AW 1 e centrifugou-se a 6000 g durante 1 minuto. Passou-se as colunas para tubos novos de 2 ml e descartou-se os tubos que continham o filtrado. Abriu-se cuidadosamente as colunas e adicionou-se 500 µl de tampão de lavagem QIAamp® AW2 e centrifugou-se a alta velocidade (20000 g) durante 3 minutos. Passou-se as colunas para tubos limpos de microcentrifuga, descartaram-se os tubos que continham o filtrado, e adicionou-se 200 µl de Tampão de eluição QIAamp® AE. Incubou-se à temperatura ambiente (15°-25°C) durante 3 minutos e centrifugou-se a 6000 g durante 1 minuto. Por fim, descartaram-se as colunas e armazenou-se os tubos com o DNA a -20°C [141].

3.4. Extracção de RNA

A extracção de RNA foi feita a partir das amostras de soro de suínos. Para tal utilizou-se o kit comercial QIAamp® Viral RNA Mini Kit (QIAGEN, California-EUA) e o protocolo “Purification of Viral RNA” do mesmo kit, para a purificação do RNA. Pipetou-se 560 µl do tampão de lise QIAamp® AVL para um tubo de microcentrifuga de 1,5 ml, adicionou-se 140 µl da amostra de soro e homogeneizou-se no vortex durante 15 segundos.

Após a homogeneização incubou-se a amostra à temperatura ambiente (15-25°C) durante 10 minutos. Centrifugou-se brevemente o tubo para remover as gotas da tampa e adicionou-se 560 µl de etanol absoluto (Merck, Darmstad, Alemanha) à amostra. Homogeneizou-se no vortex durante 15 segundos e centrifugou-se brevemente. Pipetou-se 630 µl da solução para uma coluna, QIAmp® Viral RNA e centrifugou-se a 6000 g durante 1 minuto. Colocou-se a coluna num tubo de colheita novo e descartou-se o tubo que continha o filtrado da centrifugação. Abriu-se novamente a coluna e passou-se os restantes 630 µl da solução que estava no tubo de 1,5 ml. Centrifugou-se a 6000 g durante 1 minuto, à temperatura ambiente. Após a centrifugação colocou-se a coluna num tubo novo, descartou-se o tubo que continha o filtrado e adicionou-se 500 µl de tampão lavagem QIAmp® AW1. Centrifugou-se a 6000 g durante 1 minuto e passou-se a coluna para um tubo novo de 2 ml, descartando o tubo que continha o filtrado. Adicionou-se à coluna 500 µl de tampão de lavagem QIAmp® AW2 e centrifugou-se a alta velocidade (20000 g) durante 3 minutos. Colocou-se a coluna num tubo limpo de 1,5 ml e descartou-se o tubo de colheita com o filtrado. Abriu-se a coluna e adicionou-se 60 µl de tampão de eluição QIAmp® AVE e incubou-se à temperatura ambiente durante 3 minutos. Centrifugou-se a 6000 g durante 1 minuto. Por fim, descartaram-se as colunas e armazenou-se os tubos com RNA a -20 ° C [141].

3.5. Síntese de cDNA

A síntese de cDNA foi realizada com recurso a um kit comercial, QuantiTect® Reverse Transcription (Qiagen, Califórnia-EUA). Iniciou-se a reacção com a descongelação da amostras de RNA e dos componentes do kit (gDNAWipeoutBuffer; Quantiscript transcriptase reversa; Quantiscript RT buffer; RT *Primer* Mix; e RNases Free Water). Preparou-se a reacção de eliminação do DNA genómico em gelo, utilizando: 2 µl gDNAWipeout Buffer, 7×; 1 µg de amostra de RNA e RNases *Free Water* até 14 µl. Incubou-se a 42°C durante 2 minutos e em seguida colocou-se em gelo. Preparou-se a mistura de reacção da transcrição reversa QuantiTect® em gelo utilizando: 1 µl Quantiscript Reverse Transcriptase; 4 µl Quantiscript RT Buffer, 5×; 1 µl RT *Primer* Mix e 14 µl da reacção de eliminação (que contém o RNA amostral). Homogeneizou-se e incubou-se a 42°C durante 15 minutos. De seguida incubou-se a 95°C durante 3 minutos

para inactivar a Quantiscript da transcriptase reversa. Por fim adicionou-se uma alíquota a cada reacção de transcrição reversa e obteve-se assim a mistura de cDNA (Figura 6), posteriormente armazenou-se a -20°C [141].

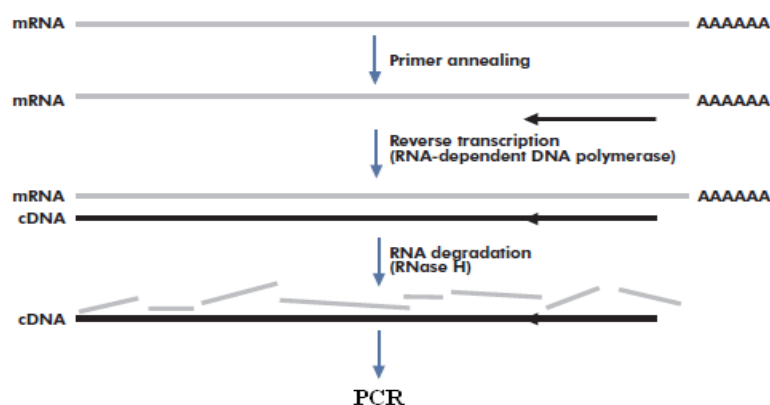


Figura 6-Esquema da síntese de cDNA, reacção de transcrição reversa, adaptado de [141].

3.6. Análise da pureza e quantificação dos ácidos nucleicos (DNA e RNA)

As amostras de DNA e RNA foram quantificadas num espectrofotómetro *GeneQuant pro* (Biochrom, Cambridge, Inglaterra) (Figura 7).



Figura 7- Espectrofotómetro da *GeneQuant pro* (Biochrom, Cambridge, Inglaterra), para quantificar os ácidos nucleicos.

Como referências utilizaram-se o tampão de eluição QIAmp® AE para amostras de DNA e tampão de eluição QIAmp® AVE para as amostras de RNA. Na medição propriamente dita, usaram-se 7 µl das amostras de DNA e RNA, colocadas na *cuvette* de ultra-microvolume, *GeneQuant*. Com o auxílio do software Biochrom Data Capture,

mediu-se a concentração e a pureza da amostra, através da leitura automática das densidades ópticas a 260 nm e 280 nm. Os cálculos da concentração e pureza baseiam-se nos seguintes princípios: a) A um comprimento de onda de 280 nm detecta-se a existência de nucleótidos e de proteínas enquanto que, a 260 nm detecta-se apenas a existência de nucleótidos; b) Uma densidade óptica de 260 nm de 1,0 corresponde a aproximadamente a 50 µg/ml de DNA de cadeia dupla, no caso do RNA/DNA de cadeia simples corresponde somente a 40 µg/ml; c) A relação $DO_{260/280}$ fornece uma estimativa da pureza dos ácidos nucleicos, os valores devem estar entre 1,8 e 2,0. Quando ocorre contaminação com solventes orgânicos ou proteínas, o valor do rácio $DO_{260/280}$ aparece alterado [2].

3.7. Desenho e optimização de *Primers*

Os *Primers* foram desenhados de acordo com a sequência do gene referência mais representativo e utilizado pelos microbiólogos (Tabela 7) [24, 38, 54, 77, 82, 98, 119, 123, 126, 129, 132, 135].

Tabela 7-Características dos *primers* e Amplicação de cada agente patológico [24, 38, 54, 77, 82, 98, 119, 123, 126, 129, 132, 135].

Agente Infeccioso	Especificidade	<i>Primer Dimer</i> (nº de ligações)	Estrutura Secundária	Temperatura de Melting (°C)	Amplicação (bp)
<i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i>	omlA gene	5	Baixa	60	952
<i>Brachyspira</i>	flaB1 gene	4	Nula	60	421
<i>Circovirus-PCV 2</i>	replicase protein	3	Baixa	60	255
<i>Chlamydia</i>	16S rRNA gene	4	Baixa	60	282
<i>Haemophilus parasuis</i>	16S rRNA	3	Nula	60	1086
<i>Influenza A</i>	gene segment 7	4	Baixa	60	188
<i>Lawsonia</i>	CRS	5	Nula	60	459
<i>Leptospira</i>	SecY gene	2	Baixa	60	285
<i>Mycoplasma hyopneumoniae</i>	mhp protein	5	Baixa	60	355
<i>Pasteurella multocida</i>	KMT1 gene	2	Nula	60	457
<i>PRRS</i>	ORF7	3	Nula	60	485
<i>Salmonella</i>	Randon sequence	4	Baixa	60	428

Para desenhar os *primers* utilizou-se um programa específico (*Primer Express 2.0*; 2006; Applied Biosystems, USA) de forma a garantir as seguintes características: Tm dos *primers* 60°C; Dímeros de *primers* inferiores a 5 ligações duplas; Estrutura secundária dos *primers* baixa ou nula. Após o desenho, os *primers* são sintetizados por empresas específicas (Ex: Sigma-Proligo; Alemanha) e otimizados de acordo com as condições de PCR pretendidas.

3.8. Detecção de agentes infecciosos por PCR

Neste trabalho todos os agentes infecciosos foram submetidos às mesmas condições de PCR, apenas variando as sequências de *primers* utilizadas para cada um dos organismos biológicos. Para a reacção de PCR, preparou-se a mistura de reacção num eppendorf com: Tampão NH₄⁺ concentrado 3,4 × (BIOLINE, Londres, Inglaterra), 10,6 mM MgCl₂ (BIOLINE, Londres, Inglaterra), 0.34 mg/ml Vermelho de cresol, Glicerol a 16,8%, 67 µM de cada dNTP (AmershamPharmaciaBiotech, Amersham Place, Inglaterra) e homogeneizou-se a mistura no vortex. Desta mistura foram utilizados 3 µl em cada reacção. Após a preparação da mistura de reacção, adicionou-se 0,2 µl de Taq DNA polimerase BIOPRO (BIOLINE, Londres, Inglaterra), 2 µl de DNA/cDNA da amostra, 1 µl de mistura de *primers* (2 a 6 nM de *primer Forward* e 2 a 6 nM de *primer Reverse*). Para além dos componentes normais de PCR, a todas as reacções foi adicionado 1 µl de uma mistura de controlo interno (contendo um gene sintético da batata – *spud*, e *primers* correspondentes a uma concentração de 1 pM) por fim adicionou-se à mistura água RNase e DNases *free* até prefazer um volume final de 10 µl. De forma a controlar as contaminações, em cada reacção de PCR foi incluído um controlo positivo e outro negativo, tendo os mesmos constituintes apenas variando na adição de 2 µl de DNA/cDNA amostral. Ao controlo positivo foi adicionado 2 µl DNA/cDNA de referência, ao controlo negativo foi adicionado 2 µl de água RNase e DNases *free*. A seguir colocou-se os tubos com a mistura de PCR no termociclador, com um programa de reacção de PCR específico, ver Tabela 8.

Tabela 8-Parâmetros do programa de PCR.

Passo	Temperatura	Tempo	Nº de Ciclos
Desnaturação Inicial	96° C	1 min	1
Desnaturação	96° C	25 Seg	40
Emparelhamento	60° C	45 Seg	
Extensão	72° C	30 Seg	
Extensão final	72° C	10 min	1

3.9. Electroforese em gel de agarose

As reacções de PCR, depois da amplificação, foram submetidas a uma electroforese em gel de agarose Seakem ME (Biowhittaker Molecular Applications, Rockland, EUA) a 4% para identificação dos produtos amplificados. A agarose foi dissolvida em TAE 1x (0,04 M Tris base (CalBiochem, EUA), 0,02 M ácido acético glacial (Merck, Darmstadt, Alemanha), 1 mM EDTA-Na₂, agitando-se durante 15 segundos. Colocou-se o preparado no microondas para a agarose se dissolver. Retirou-se o Erlenmayer do microondas e deixou-se arrefecer, adicionou-se de seguida brometo de etídio (Sigma Chemical, St Louis, EUA) (corante que permite a visualização do DNA à luz UV) de modo a obter uma concentração final de 0,8 µg/ml e agitou-se durante 15 segundos, para homogeneizar. Colocou-se o preparado no berço, deixou-se solidificar e em seguida colocou-se a 4° C. Após a solidificação, pôs-se o berço na tina de electroforese, previamente cheia com 2,5 litros de solução TAE 1x. Colocaram-se as amostras de PCR e o marcador de peso molecular 1 Kb DNARuler (molecular probes, London, UK) Figura 8 nos poços do gel e deixou-se migrar cerca de 10 minutos na voltagem máxima. As moléculas do mesmo tamanho migram conjuntamente e formam bandas. Visualizaram-se os produtos de PCR à luz UV dum transiluminador (registaram-se os resultados digitalmente, através de Canon PowerShot G9). A análise do gel foi feita com base no controlo interno, no controlo positivo e no marcador.

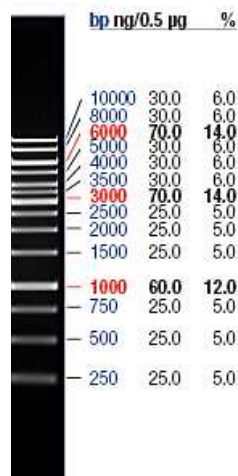


Figura 8- Esquema do marcador de peso molecular 1 Kb DNA Ruler (molecular probes, London, UK) adaptado de [142].

3.10. Detecção de sensibilidades analíticas por PCR

Neste trabalho para todos os agentes infecciosos foram analisadas as sensibilidades analíticas das reacções de PCR. Para a reacção de sensibilidade por PCR, preparou-se a mistura de reacção da mesma forma que a reacção normal de PCR, à excepção da quantidade de DNA/cDNA amostral. Para cada agente patogénico fizeram-se alíquotas, com 5 concentrações diferentes de DNA/cDNA de referência variando de 25ng/µl até 0.0025 ng/µl, e pipetou-se 2 µl de cada uma para um tubo de reacção. Após a preparação das diferentes diluições, adicionou-se a cada uma 3 µl de mistura de reacção, 0,2 µl de Taq DNA polimerase BIOPRO (5U/µl) (BIOLINE, Londres, Inglaterra), 1 µl de mistura de *primers* (2 nM de *primer Forward* e 2 nM de *primer Reverse*), 1 µl da mistura de controlo de interno (contendo um gene sintético da batata – *spud*, e *primers* correspondentes a uma concentração de 1 pM) e por fim, adicionou-se à mistura água RNase e DNases *free* até prefazer um volume final de 10 µl. A seguir colocou-se os tubos com a mistura de PCR no termociclador, com um programa de reacção de PCR específico, esquema na Tabela 8.

3.11. Análise estatística dos resultados

Os dados obtidos neste estudo foram analisados utilizando o programa de estatística STATISTICA 9.1 (StatSoft, Inc., 2009).

3.11.1. Pureza e concentração das amostras biológicas

No estudo da pureza e concentração dos DNAs e RNAs, foram calculadas médias e desvios-padrão em relação às suas concentrações, quantidade de proteínas e sais. Esta análise estatística foi efectuada na totalidade dos DNAs e RNAs estudados, tendo como finalidade verificar se as condições das amostras biológicas utilizadas eram aceitáveis.

3.11.2. Frequências de infecção dos diferentes vírus e bactérias

Nesta análise utilizou-se os resultados dos 100 indivíduos que compunham a amostra inicial e os resultados da reacção de PCR para os 12 tipos de agentes patogénicos. As frequências de infecção e a prevalência dos diferentes agentes infecciosos em cada uma das amostras foram calculadas a partir das percentagens obtidas para cada um dos agentes.

3.11.3. Frequências de infecção obtidas versus frequência geral de infecção em Portugal e Europa

Nesta análise utilizou-se os resultados dos 100 indivíduos que compunham a amostra e os dados veterinários privados* obtidos no decorrer do ano de 2010. As frequências de infecção e a prevalência dos diferentes agentes infecciosos, em cada uma das populações, população padrão e população analisada, foram comparadas a partir das percentagens obtidas para cada um dos agentes. Para comparar estatisticamente os dois grupos de amostras utilizou-se o Teste χ^2 (2×2). O objectivo desta análise foi verificar a existência de diferenças significativas entre os grupos de indivíduos. Nesta análise são consideradas estatisticamente significativas todas as frequências que apresentam um valor de $p < 0,05$.

3.11.4. Frequências de infecção múltipla

Nesta análise utilizou-se os resultados dos 100 indivíduos que compunham a amostra inicial e os resultados da reacção de PCR para os 12 tipos de agentes patogénicos. Na

| *Valores gerais de infecção obtidos numa exploração suinícola da região de Coimbra, gentilmente cedidos pela Genebox.

análise das taxas de infecção múltipla utilizou-se as amostras positivas para mais de um agente infeccioso. As frequências de infecção múltipla e a prevalência dos diferentes agentes infecciosos em cada grupo foram calculadas a partir das percentagens amostrais obtidas.

3.11.5. Frequências de infecção por grupo patológico

Nesta análise utilizou-se os resultados dos 100 indivíduos que compunham a amostra inicial e os resultados da reacção de PCR para os 12 tipos de agentes patogénicos agrupados por doença. Os grupos patológicos analisados foram: doenças respiratórias, doenças intestinais e doenças reprodutivas. As frequências de infecção e a prevalência dos diferentes agentes infecciosos em cada um dos grupos foram calculadas a partir das percentagens obtidas para cada um dos agentes em cada grupo patológico.

4. Resultados e Discussão

4.1. Pureza e concentração das amostras biológicas

No estudo da pureza e concentração dos DNAs e RNAs foi calculada a média e desvios padrão das medições obtidas. Esta análise estatística foi efectuada na totalidade das amostras de DNA e RNA extraídas, tendo como finalidade verificar se as condições dos DNAs e RNAs utilizados eram aceitáveis para que houvesse confiança nos resultados do estudo. Embora a concentração média de DNA não seja uniforme (62,8 ng/μl, +/- 56,4), Tabela 9, e seja inferior ao desejável (100 ng/μl) para a análise por PCR, não se verificaram quaisquer problemas na amplificação por esta técnica, uma vez que se adaptou o protocolo de amplificação à concentração de DNA das amostras e como se tratam de amostras microbiológicas o limite de detecção baixa significativamente [143]. Em relação aos valores médios da pureza dos DNAs estes estão dentro dos limites aceitáveis (1,95), Tabela 9, 1,8-2,0 para D.O.260nm/D.O.280nm [2, 143]. Contudo alguns destes DNAs apresentaram quantidades de sal e de proteínas elevadas, estando o intervalo de confiança acima dos limites aceitáveis. Na análise destes DNAs não se verificaram problemas na amplificação por PCR, uma vez que se adoptou um protocolo robusto de amplificação. Estes resultados são evidenciados pelos coeficientes de variação que demonstram a existência de amostras que se desviam dos padrões aceitáveis, tanto na concentração de DNA como na quantidade de contaminantes. Estes DNAs podem afectar alguns resultados, contudo, a maioria das amostras apresenta um grau de pureza bastante aceitável, Tabela 9.

Tabela 9- Médias dos dados de pureza e concentração das amostras de DNA.

	Concentração ng/μl	D.O.260nm/ D.O.280nm
Média	62,8	1,95
Desvio Padrão	56,4	0,43
Coeficiente de Variação	89,8%	22%
Intervalo de Confiança (referência)	80-120 ^[2, 143]	1,8-2,0 ^[2, 143]

Em relação à concentração de RNA, embora esta não seja uniforme em média (+/- 50,4 ng/μl, +/- 20,2) situa-se dentro do limiar desejável (50 ng/μl) [143] para a realização

da técnica de PCR (Tabela 10). Os valores médios da razão D.O.260nm/D.O.280nm dos RNAs (+/- 2,1) também se situaram dentro dos limites de pureza amostral aceitáveis, de 1,9-2,1, Tabela 10 [143]. Porém, alguns RNAs apresentaram quantidades de contaminantes elevadas, mas a sua análise por PCR não foi afectada, uma vez que se adoptou um protocolo robusto de amplificação. Estes resultados são evidenciados pelos coeficientes de variação que demonstram a existência de algumas amostras fora dos padrões aceitáveis, mas a maioria apresenta um grau de pureza e concentração óptimos, Tabela 10 [143].

Tabela 10- Médias dos dados de pureza e concentração das amostras de RNA.

	Concentração ng/μl	D.O.260nm/ D.O.280nm
Média	50,4	2,1
Desvio Padrão	20,2	0,73
Coeficiente de Variação	40,1%	34,8%
Intervalo de confiança (referencia)	40-60 ^[143]	1,9-2,1 ^[143]

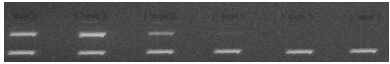
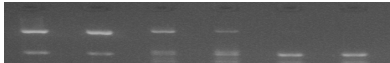
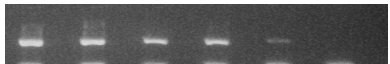
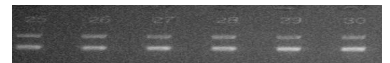
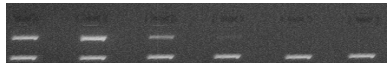
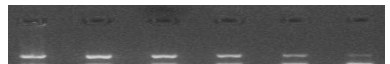
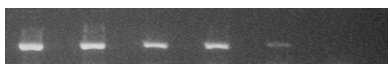
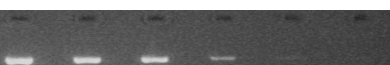

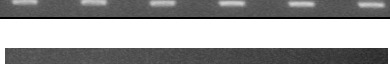
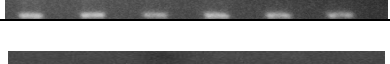
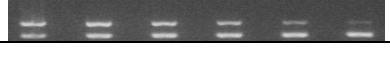
Em suma, algumas amostras biológicas (Tabelas 9 e 10) não apresentaram a concentração ideal. Porém, o ajuste das suas concentrações aos protocolos de PCR utilizados permitiu minimizar a influência de baixas ou elevadas concentrações das amostras na amplificação por PCR. As elevadas concentrações de contaminantes (Tabelas 9 e 10) encontradas em algumas amostras, não influenciaram significativamente a obtenção dos dados por PCR, uma vez que não foi notado qualquer problema de amplificação nessas amostras. Assim, podemos considerar que as amostras utilizadas estavam em boas condições e que não influenciaram a fiabilidade global do estudo.

4.2. Especificidade e sensibilidades analíticas de detecção por PCR

Na reacção de PCR é essencial saber qual a região genómica que se pretende amplificar, a especificidade da detecção, bem como qual o limite mínimo de detecção, sensibilidade analítica. Na Tabela 7 está representado o Amplicão, ou seja o produto esperado da PCR, para cada microrganismo estudado e a sua especificidade. Em relação à especificidade, os *primers* desenvolvidos e optimizados apresentaram uma especificidade

de 100% em relação a todos os microorganismos avaliados. Não se registaram, desta forma, nenhum falso positivo ou falso negativo na detecção dos diferentes agentes por PCR.

Tabela 11- Médias da sensibilidade e especificidade dos *primers* para cada agente infeccioso [24, 38, 54, 77, 82, 98, 119, 123, 126, 129, 132, 135].

Agentes Infecciosos	Gene alvo	Especificidade	Sensibilidade (ng/μl do controlo positivo)	Electroforese (concentração em ng/μl: 100; 10; 1; 0,1; 0,01; 0,001)
<i>APP</i>	oml	0.999	0,1	
<i>Brachyspira</i>	flaB1	0.999	0,1	
<i>Chlamydia</i>	16S rRNA	0.999	0,01	
<i>SacII-PCV2</i>	Replicase protein	0.999	0,001	
<i>Haemophilus parasuis</i>	16S rRNA	0.999	0,1	
<i>Influenza A</i>	Segment 7	0.999	0,001	
<i>Lawsonia</i>	CRS	0.999	0,01	
<i>Leptospira</i>	SecY	0.999	0,01	
<i>Mycoplasma hyopneumoniae</i>	mhp protein	0.999	0,1	
<i>Pasteurella</i>	KMT1	0.999	0,01	
<i>PRRS</i>	ORF7	0.999	0,001	
<i>Salmonella spp</i>	Randon sequence	0.999	0,01	

Em relação à sensibilidade dos testes de PCR, os nossos resultados evidenciaram que existem diferenças significativas entre agentes. Estas sensibilidades variam de 0,1 a 0,001

ng/μl, isto deve-se não só às características genéticas do agente (ou seja o tamanho do genoma, o que é reflectido pela sensibilidade máxima apenas ser registada em genomas virais) e às características específicas dos *primers* envolvidos na PCR (reflectido pela diferença registada entre bactérias, de 0,1 a 0,01 ng/μl, com tamanhos de genomas idênticos). A sensibilidade está ainda relacionada com a natureza da região alvo, através da eficiência de ligação do *primer* que determina a eficiência de amplificação (evidenciado pelos valores de sensibilidade dos genes *16S rRNA*) [2, 19].

Resumindo, todos os testes de PCR realizados apresentaram especificidades máximas, o que indica que a detecção molecular dos agentes infecciosos é um bom método de *screening* de microrganismos (Tabela 11). No caso das sensibilidades, a taxa de sucesso da PCR também foi bastante elevada o que indica que o método de tipagem realizado é um método robusto e bastante eficaz, mesmo a baixas concentrações dos agentes infecciosos. Tanto a especificidade como a sensibilidade corresponderam às expectativas iniciais do desenvolvimento dos testes de PCR.

4.3. Detecção de agentes patogénicos por PCR e taxas de infecção

Neste estudo foi avaliada a presença de vários agentes infecciosos, bactérias e vírus, em amostras de soro de suínos. Foi calculada a percentagem de cada agente infeccioso nas 100 amostras, Tabela 12. Para além do cálculo de incidência para cada agente infeccioso também se comparou os resultados obtidos com uma população suína padrão e com dados Europeus descritos na literatura (Tabela 12). No total das 100 amostras, apenas 25% apresentaram total ausência de infecção, ou seja, não apresentaram vestígios de nenhum dos 12 agentes analisados. Complementarmente, 75% das amostras apresentaram incidência de pelo menos 1 dos 12 agentes infecciosos, ou seja, apresentavam vestígios de infecção (Tabela 12).

A bactéria *Actinobacillus pleuropneumoniae* (APP), responsável por causar pleuropneumonia nos suínos [21], apresentou um grau de incidência de 10%, ou seja, das 100 amostras analisadas 10 eram positivas para esta bactéria (Tabela 12). Estes resultados estão de acordo com o expectável, uma vez que os referenciais europeus se situam na ordem dos 6% e a nossa população padrão apresentou níveis de prevalência na ordem dos 9%. Esta ligeira diferença entre os valores europeus e portugueses pode dever-se às

condições ambientais, que podem ser mais propícias à propagação da bactéria, nomeadamente no que diz respeito à temperatura média e humidade relativa do nosso país, que é ligeiramente diferente dos restantes países europeus [21, 22, 25].

Tabela 12- Frequências de infecção para cada agente infeccioso estudado nas diferentes populações analisadas. (NS – Não Significativo)

Agentes infecciosos	Amostragem estudada		População Padrão (% positivos)	Teste χ^2 (valor de p)	Referenciais Europeus (% positivos)
	Positividade (%)	Negatividade (%)			
<i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i>	10	90	9	NS (0.81)	6 ^[144]
<i>Brachyspira</i>	7	93	9	NS (0.60)	10.8 ^[145]
<i>Chlamydia</i>	11	89	9	NS (0.64)	9 ^[3]
<i>Circovirus-PCV 2</i>	33	67	35	NS (0.77)	38.3 ^[146]
<i>Haemophilus parasuis</i>	18	82	19	NS (0.86)	22 ^[144]
<i>Influenza A</i>	34	66	32	NS (0.76)	35 ^[147]
<i>Lawsonia intracellularis</i>	7	93	6	NS (0.77)	5.5 ^[145]
<i>Leptospira</i>	15	85	16	NS (0.84)	20 ^[148]
<i>Mycoplasma hyopneumoniae</i>	5	95	6	NS (0.76)	9.3 ^[149]
<i>Pasteurella multocida</i>	8	92	10	NS (0.62)	11.8 ^[144]
<i>PRRS</i>	35	65	38	NS (0.66)	22.9 ^[150]
<i>Salmonella</i>	1	99	1	NS (1)	1 ^[151]
Total dos agentes analisados	75	25	77	NS (0.77)	-

O género *Brachyspira* é responsável por doenças intestinais em suínos, este género de bactérias está presente no intestino grosso de alguns animais [36]. A *Brachyspira* apresentou uma frequência relativa de 7%, ou seja, 7 das 100 amostras analisadas eram positivas (Tabela 12). Embora haja uma ligeira diferença entre os valores obtidos e os referenciais europeus, esta não é significativa, uma vez que os resultados europeus se situam na ordem dos 10.8% e os da população padrão na ordem dos 9% (Tabela 12). Esta discrepância pode dever-se ao tipo de amostragem, uma vez que as amostras usadas neste

estudo são amostras de soro, enquanto que as amostras utilizadas nos referenciais são de fezes de animais [38, 39, 41].

No que respeita às amostras positivas para o género *Chlamydia*, obtivemos um grau de prevalência de 11%, isto é, 11 das 100 amostras analisadas continham esta bactéria (Tabela 12). Este género provoca doenças respiratórias, reprodutivas e intestinais em suínos [3, 45]. Os resultados obtidos neste estudo estão de acordo com as amostras padrão, uma vez que os referenciais europeus e população padrão se situam na ordem dos 9% de prevalência (Tabela 12).

Segundo a literatura estudada o *Circovirus* tipo 2 é patogénico nos suínos e responsável por provocar quer doenças respiratórias quer doenças reprodutivas [29, 30]. As infecções provocadas por este tipo vírus por vezes podem levar à morte dos animais sendo a sua prevenção e tratamento efectuada através da vacinação dos animais [1]. Este vírus apresentou um grau de incidência elevado nas amostras estudadas, com uma percentagem de 33%, Tabela 12. Estes resultados estão de acordo com o expectável, uma vez que os referenciais europeus se situam na ordem dos 38.3% e a população padrão apresentou níveis de prevalência na ordem dos 35%, Tabela 12. Este vírus é assim um dos principais agentes infecciosos de suínos em Portugal e na Europa [27].

Na pesquisa da bactéria *Haemophilus parasuis* 18% das amostras foram positivas, comparando com alguns dos outros agentes infecciosos, apresenta uma prevalência de infecção bastante significativa. Estes resultados estão de acordo com as amostras referência, pois a prevalência nos referenciais europeus é de 22% e na população padrão situam-se na ordem dos 19% de prevalência, Tabela 12. Esta bactéria é responsável pelo desenvolvimento de algumas doenças respiratórias graves em suínos e devido à sua elevada incidência é responsável pela perda substancial de animais nas suiniculturas [19].

O vírus *Influenza*, agente infeccioso responsável pela gripe em suínos [76], apresentou uma percentagem de incidência de 34%, Tabela 12. Em relação aos restantes agentes infecciosos registou a segunda maior taxa de prevalência nas amostras estudadas. Estes níveis de prevalência estão de acordo com o espectável, uma vez que os referenciais europeus se situam na ordem dos 35% e a população padrão apresentou níveis na ordem dos 32% (Tabela 12). Tal como o PCV2, este vírus é um dos principais agentes infecciosos de suínos em Portugal e na Europa [79, 140].

Tal como a *Brachyspira*, a *Lawsonia intracellularis* é responsável por doenças intestinais em suínos [83, 88]. Esta bactéria também apresentou uma frequência relativa de 7%, igual à da *Brachyspira* (Tabela 12). Contudo não apresentou diferenças entre os valores obtidos e os referenciais europeus, uma vez que os resultados europeus situam-se na ordem dos 5.5% e a população padrão registou 6% de positividade (Tabela 12). Com estes resultados podemos considerar que a *Lawsonia intracellularis* é um dos agentes infecciosos menos prevalentes nos suínos em Portugal e na Europa [145].

O género *Leptospira* é responsável por provocar Leptospirose em suínos, esta doença apresenta elevada prevalência a nível mundial [4, 24]. Nas 100 amostras analisadas 15 apresentaram positividade para esta bactéria, Tabela 12. Estes resultados estão de acordo com a população padrão que registou 16% de prevalência, Tabela 12. Contudo há uma ligeira diferença entre os valores obtidos e os referenciais europeus que apresentaram 20% de positividade (Tabela 12). Esta discrepância pode dever-se à amostragem que é bastante superior no artigo de referência, na ordem dos 3 000 indivíduos [147].

No caso da bactéria *Mycoplasma hyopneumonia*, agente primário responsável por causar pneumonia enzoótica em suínos [92, 93, 134], 5% das amostras estudadas apresentaram reacções positivas, Tabela 12. Esta baixa taxa de incidência parece estar de acordo com população padrão (6% de positividade), mas discrepante com a referência europeia que apresentou valores de 9.3% de prevalência Tabela 12. Esta diferença entre os valores europeus e portugueses pode dever-se às condições ambientais do nosso país, que podem ser menos propícias à propagação da bactéria, nomeadamente no que diz respeito à temperatura média e humidade relativa do nosso país, que é ligeiramente diferente dos restantes países europeus [24, 94].

Na pesquisa de *Pasteurella multocida* detectaram-se 8 amostras positivas nas 100 amostras analisadas, ou seja, uma incidência de 8%, Tabela 12. Estes resultados estão de acordo com as amostras referência, pois a prevalência nos referenciais europeus é de 11.8% e na população padrão situam-se na ordem dos 10% de prevalência, Tabela 12 [144]. Embora a sua taxa de prevalência não seja muito elevada esta bactéria é responsável pelo desenvolvimento de algumas doenças respiratórias graves em suínos [98, 102].

O vírus *PRRS* é responsável por uma doença muito frequente em suínos de todo o mundo, sendo a sua vertente respiratória de fácil propagação entre animais [105, 108]. Nas

amostras analisadas 35% foram positivas para o vírus (Tabela 12), ou seja, 35 das 100 amostras continham o seu RNA viral. Este agente infeccioso apresentou o maior grau de incidência quer na nossa amostragem quer nos referenciais utilizados, tabela 12. Este vírus apresentou uma taxa de prevalência na ordem dos 22.9% nos referenciais europeus e de 38% na população padrão, Tabela 12. Apesar de não significativas, existem diferenças na taxa de prevalência entre Portugal e a Europa. Esta ligeira discrepância pode dever-se às condições ambientais do nosso país, que podem ser mais propícias à propagação do vírus, bem como ao próprio tamanho da exploração, que é substancialmente menor em Portugal, diminuindo assim a propagação entre animais da doença [34, 35, 106]. Contudo, este vírus é sem dúvida o principal agente infeccioso de suínos em Portugal e na Europa [108].

A bactéria *Salmonella* é um agente infeccioso muito importante, a nível mundial, por causar doenças tanto em animais como em humanos [61-64]. Contudo a incidência desta bactéria nas amostras estudadas não foi além de 1%, Tabela 12. Sendo o agente infeccioso com menos percentagem de incidência quer na nossa amostragem quer nas amostras referência, ambas de 1% Tabela 12 [151].

Em síntese, apenas 25% das amostras apresentaram ausência de infecção, sendo as restantes 75% positivas para pelo menos um dos agentes infecciosos. Os vírus *PRRS*, *Influenza* e *PCV2* foram os agentes patogénicos com maior percentagem de incidência na nossa amostragem, na ordem dos 33 a 35%. Por outro lado o género *Salmonella* apresentou a menor taxa de incidência amostral com apenas 1% de positividade. Os restantes agentes infecciosos alcançaram níveis de prevalência muito variáveis entre os 5 e os 18%. Os resultados alcançados neste estudo provaram estar de acordo com os referenciais Portugueses e Europeus, sendo não significativas as diferenças verificadas.

4.3.1. Taxas de infecção múltipla

Além das frequências de infecção isoladas, também encontramos alguns suínos infectados com mais de um agente infeccioso, a esses casos designamos de infecção múltipla. Na Tabela 13 estão evidenciados os resultados das infecções múltiplas para cada agente infeccioso estudado. Na horizontal encontramos os agentes de infecção secundária, ou seja, os que apresentaram incidência em amostras que já estavam infectadas com outro agente. Na vertical estão representados os resultados dos agentes principais, onde foi avaliada a taxa de incidência de cada um nas 100 amostras analisadas.

Tabela 13- Taxa de infecção múltipla nos diferentes agentes infecciosos (n = número de amostras infectadas).

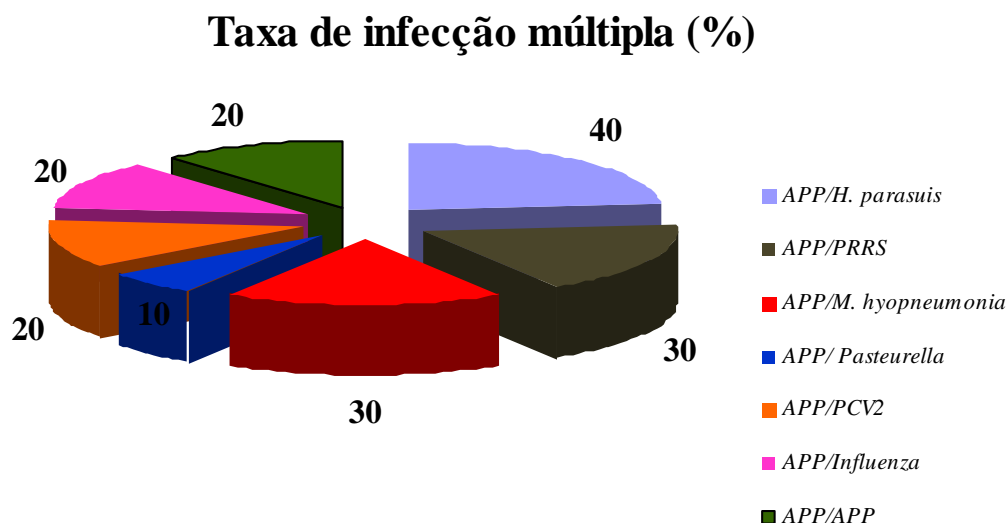
Agente Principal	Agente Secundário (%)											
	<i>APP</i>	<i>Brac.</i>	<i>Chla.</i>	<i>PCV 2</i>	<i>H.par</i>	<i>Infl.</i>	<i>Law.</i>	<i>Lept.</i>	<i>M.hyo</i>	<i>P.mul</i>	<i>PRRS</i>	<i>Salm.</i>
<i>APP</i> (n=10)	20	0	0	20	40	20	0	0	30	10	30	0
<i>Brac.</i> (n= 7)	0	14	0	0	0	14	57	0	0	43	14	14
<i>Chla.</i> (n=11)	0	0	0	91	36	100	0	9	0	0	27	0
<i>PCV2</i> (n=33)	6	0	30	0	15	66	0	1	0	0	48	0
<i>H.par</i> (n=18)	22	0	22	28	0	33	0	0	11	0	16	0
<i>Infl.</i> (n= 34)	6	3	32	65	18	15	6	6	0	0	38	0
<i>Law.</i> (n=7)	0	57	0	0	0	28	14	0	0	28	14	0
<i>Lept.</i> (n=15)	0	0	6	13	0	13	0	13	0	0	0	0
<i>M. hyo</i> (n=5)	60	0	0	0	40	0	0	0	40	0	0	0
<i>P.mul</i> (n=8)	12	37	0	0	0	0	25	0	0	0	25	0
<i>PRRS</i> (n=35)	8	3	8	46	8	37	3	0	0	6	40	0
<i>Salm.</i> (n=1)	0	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Segundo alguns autores, o *APP* pode surgir isolado (Gráfico 1 e Tabela 13) ou associado a outros agentes infecciosos [25], nomeadamente a: *Mycoplasma*

hyopneumoniae; *Haemophilus parasuis*; *PRRS*; *PCV2*, *Pasteurella* e *Influenza*. Neste estudo, o *Mycoplasma hyopneumoniae* e o *APP* apareceram associados em 3 das 100 amostras analisadas, Gráfico 1. A infecção por *Mycoplasma hyopneumoniae* provoca danos nas vias respiratórias dos animais, deixando-os mais vulneráveis a infecções secundárias [22]. Deste modo, os animais infectados por *Mycoplasma hyopneumoniae*, ficam mais susceptíveis ao aparecimento de *APP*. Nos casos em que estas duas bactérias surgem conjuntamente, há um agravamento dos sintomas apresentados pelos animais levando a prognósticos mais reservados [22]. Além de *Mycoplasma hyopneumoniae* as amostras com *APP* também aparecem associadas a outros agentes patogénicos. A associação ao *Haemophilus parasuis* foi verificada em 4 das 100 amostras analisadas (Gráfico 1), apesar de menos referenciada, esta dupla infecção parece ser comum em suínos. Os vírus *PRRS*, *PCV2* e *Influenza* também aparecem associados ao *APP*, em 20 a 30% das amostras positivas para esta bactéria (Gráfico 1). A *Pasteurella* foi a bactéria que apresentou menor grau de incidência nas amostras contaminadas com *APP*. Como todos estes agentes provocam danos nas vias respiratórias dos animais, é muito comum a infecção múltipla de suínos com estes vírus e bactérias em casos críticos de doença respiratória [12, 73, 80, 106, 127].

Em relação ao género *Brachyspira*, este pode surgir isolado (Tabela 13) ou associado a outros agentes infecciosos [152]. Neste estudo, a *Lawsonia intracellularis* parece ser o microorganismo com maior percentagem de associação à *Brachyspira* com 57% de associação (Tabela 13). Estes resultados estão de acordo com o esperado uma vez que ambas as bactérias estão associadas a doenças intestinais em suínos, sendo muito frequente a infecção conjunta destes dois tipos de bactérias [44, 86, 152]. Em segundo lugar o género *Brachyspira* aparece associado à *Pasteurella multocida*, em 43% das amostras positivas para *Brachyspira* (Tabela 13). Segundo alguns autores, estas bactérias podem surgir associadas, uma vez que a infecção por *Pasteurella multocida*, responsável por algumas doenças respiratórias, pode ser consequência da debilidade causada pela infecção da *Brachyspira* no trato intestinal [9, 44]. Por último, os vírus *PRRS* e *Influenza*, e a bactéria *Salmonella* aparecem associados com o género *Brachyspira*, em 14% das amostras positivas para esta bactéria, ou seja, numa das 7 amostras (Tabela 13). A mesma percentagem de amostras apresentou o género *Brachyspira* isolado, indicando que este tipo de bactéria aparece preferencialmente associado a outro tipo de agentes infecciosos.

Gráfico 1 - Taxa de infecção múltipla de APP e outros agentes infecciosos.



Contrariamente ao *APP* e *Brachyspira*, o género *Chlamydia* não foi detectado isoladamente. Isto é, as amostras positivas para esta bactéria apresentaram sempre positividade para outro agente infeccioso. Os vírus *Influenza*, *PCV2*, *PRRS* e a bactéria *Haemophilus parasuis* são exemplo dos agentes que apareceram associados ao género *Chlamydia*. O vírus *Influenza* foi o agente infeccioso que apresentou maior grau de associação com a *Chlamydia*, apresentando 100% de positividade nas amostras infectadas por esta bactéria (Tabela 13). Estes resultados reforçam a ideia de que os indivíduos com doenças do foro respiratório aparecem infectados com mais do que um agente infeccioso [98]. O *PCV2*, outro vírus responsável por doenças do trato respiratório, foi o segundo agente que apresentou maior grau de associação (com 91%) com o género *Chlamydia* (Tabela 13). A bactéria *Haemophilus parasuis* e o vírus *PRRS* também apresentaram percentagens de associação bastante elevadas, de 36 e 27% respectivamente (Tabela 13). Estas percentagens de associação justificam-se pelo facto de estes agentes infecciosos provocarem alterações respiratórias e reprodutivas em suínos, sendo muito comum a infecção múltipla em casos críticos desta patologia [106].

Tal como o género *Chlamydia*, o vírus *PCV2* não foi detectado isoladamente, tendo, todas as amostras positivas para este vírus, infecção múltipla. Os agentes infecciosos associados ao *PCV2* foram: *APP*, *Chlamydia*, *Haemophilus parasuis*, *Influenza*, *Leptospira* e *PRRS* com uma taxa de associação que variou entre 1 e 66% (Tabela 13). De todos os

agentes que apareceram associados com o PCV2, destacam-se os vírus da *Influenza* (66%) e *PRRS* (48%) e a bactéria *Chlamydia* (30%) e, com graus de associação muito elevados (Tabela 13). Estes agentes são responsáveis por provocar doenças respiratórias e reprodutivas, tendo sido descrita uma inter-relação complexa entre estes agentes infecciosos, alguns dos quais antecedem o aparecimento de outros e potenciam o efeito patogénico [34].

A bactéria *Haemophilus parasuis* faz parte dos agentes infecciosos que não surgiram isolados, ou seja, surgiu sempre associada a outro agente. O agente que apresentou maior grau de associação com esta bactéria foi a *Influenza A* (33%) (Tabela 13). Os outros agentes tiveram um grau de associação entre os 11 e os 28%, nomeadamente o *Mycoplasma hyopneumoniae*, o *PRRS*, o *APP*, a *Chlamydia* e o *PCV2* (Tabela 13). Estes agentes estão maioritariamente associados a doenças respiratórias daí a sua presença simultaneamente com o *Haemophilus parasuis* [12, 70, 106, 149]. Por vezes, basta o animal estar infectado com um tipo de vírus ou bactéria para a sua imunidade baixar e este ficar mais susceptível a outros agentes infecciosos, daí proporcionar-se a infecção múltipla [12, 70, 106, 149].

Neste estudo, o vírus *Influenza* foi detectado tanto isoladamente (15%) como associado a outros agentes infecciosos (Tabela 13). As amostras infectadas com este vírus apresentaram a presença de: *APP*, *PCV2*, *PRRS*, *Haemophilus parasuis*, *Chlamydia*, *Brachyspira*, *Lawsonia* e *Leptospira*. A maioria destes agentes patogénicos está envolvida em doenças respiratórias, exceptuando-se a *Brachyspira* e a *Lawsonia* [152]. A percentagem de associação destes agentes ao vírus *Influenza* variou de 3 a 65% (Tabela 13). O *PCV2* foi o agente infeccioso que apresentou maior grau de associação com a *Influenza A*, isto é, 65% das amostras positivas para *Influenza A* também estavam infectadas com o vírus *PCV2* (Tabela 13). Além do *PCV2*, destacam-se ainda o *PRRS* e a *Chlamydia*, com um grau de percentagens de associação de 38% e 32%, respectivamente (Tabela 13). Estes 4 agentes são responsáveis por provocar doenças respiratórias, para além das reprodutivas e intestinais, tendo sido descritas relações complexas entre eles, nomeadamente em alguns casos podendo potenciar o efeito patogénico da doença [34].

A *Lawsonia intracellularis* foi um dos agentes pesquisados que surgiu tanto associado a outros agentes infecciosos como isoladamente (em 14% das amostras) (Tabela

13). As amostras infectadas por esta bactéria surgiram associadas a: *Brachyspira* (57%), *Influenza A* (28%), *Pasteurella multocida* (28%) e *PRRS* (14%) (Tabela 13). A *Brachyspira* foi o agente infeccioso que apresentou maior percentagem de associação com a *Lawsonia intracellularis*, estes resultados estão de acordo com as referências bibliográficas uma vez que ambas as bactérias são responsáveis por provocar doenças intestinais [88, 152, 153]. Por outro lado a associação desta bactéria com os restantes agentes infecciosos, responsáveis sobretudo por doenças respiratórias, pode ser explicado pela debilidade causada pela infecção no trato intestinal provocando o aparecimento de outro tipo de patologias [84, 154].

Das 15 amostras infectadas com o género *Leptospira*, 6% estavam infectadas com *Chlamydia* e 13% estavam infectadas com *PCV2* e *Influenza A* (Tabela 13). A *Influenza A*, a *Chlamydia*, o *PCV2* e a *Leptospira* são responsáveis por causar doenças respiratórias, reprodutivas e intestinais (*Chlamydia*), desta forma os resultados obtidos reforçam a percepção de que a infecção múltipla em suínos é bastante comum [155]. Além de figurar em conjunto com outros agentes infecciosos, a *Leptospira* também ocorreu isoladamente, tendo uma taxa de 13%, ou seja, 2 das 15 amostras positivas para a *Leptospira* (Tabela 13).

No caso da bactéria *Mycoplasma hyopneumoniae*, nas amostras analisadas esta bactéria apareceu isoladamente (em 40% dos casos) e associada a outros agentes infecciosos (Tabela 13). Das amostras positivas para *Mycoplasma hyopneumoniae*, 60% apresentaram infecção conjunta com *APP* e 40% com *Haemophilus parasuis* (Tabela 13). O aparecimento destas bactérias em conjunto com o *Mycoplasma hyopneumoniae* deve-se ao facto de serem responsáveis pelo mesmo tipo de infecção respiratórias nos animais infectados [96]. Como referido anteriormente, suínos infectados com *Mycoplasma hyopneumoniae*, quando infeccionados com outros agentes infecciosos como o *APP*, os sintomas desses animais agravam-se significativamente, sendo muito comum a infecção múltipla destes agentes [96].

Na pesquisa de *Pasteurella multocida*, 37% das amostras positivas para esta bactéria apresentaram infecção múltipla com *Brachyspira*; 25% com *PRRS*; 25% *Lawsonia* e 12% com *APP* (Tabela 13). Estes agentes são responsáveis por provocar doenças respiratórias, reprodutivas e intestinais, apresentando inter-relações complexas entre eles, podendo alguns anteceder o aparecimento de outros e potenciar o seu efeito patogénico. No caso da

Brachyspira e da *Lawsonia* a debilidade causada pela infecção no trato intestinal pode anteceder o aparecimento de infecções respiratórias [9, 100].

As amostras contaminadas com *PRRS*, agente com maior taxa de incidência na nossa amostragem, também apresentaram infecção múltipla. Este vírus aparece isoladamente em 40% das amostras e em associação nos restantes 60% (Tabela 13). Em 46% dos casos associa-se ao *PCV2*; em 37% à *Influenza A*; em 8% às bactérias, *APP*, *Haemophilus parasuis* e *Chlamydia*; e por último em 3% à *Brachyspira* e *Lawsonia* (Tabela 13). Tal como na *Pasteurella multocida*, estes agentes são responsáveis por provocar doenças respiratórias, reprodutivas e intestinais, cujas inter-relações entre eles são responsáveis por potenciar o seu efeito patogénico em suínos [106, 108].

Finalmente, a bactéria *Salmonella*, com apenas uma amostra positiva, aparece conjuntamente com a *Brachyspira*, ou seja, 100% das amostras positivas apresentaram infecção múltipla (Tabela 13). Estes resultados estão de acordo com o referenciado, uma vez que ambas estão envolvidas no aparecimento de doenças intestinais, em suínos, e potenciam-se mutuamente [64].

Sintetizando, todos os agentes patogénicos investigados apresentaram infecção múltipla, sendo esta condição muito frequente em suínos devido às próprias condições das explorações [35]. A taxa média de infecção múltipla situou-se acima dos 27 % tendo atingido os 100% em 2 dos agentes analisados (*Chlamydia* e *Salmonella*) (Tabela 13). Os agentes responsáveis pela infecção múltipla são variados, tanto vírus como bactérias, e normalmente, pertencem ao mesmo grupo patológico. Estas inter-relações entre agentes patogénicos distintos são responsáveis por potenciar o efeito patogénico do agente primário da infecção [104, 156]. Apesar disso, existem casos de infecção múltipla provocados por agentes de grupos patológicos distintos, como por exemplo *Brachyspira* e *Pasteurella multocida*, que são explicadas através da debilidade imunológica provocada pelo agente primário da infecção [9].

4.3.2. Taxas de infecção por grupos patológicos

Segundo a bibliografia estudada, os agentes infecciosos estudados são responsáveis, essencialmente, por três grupos patológicos distintos: doenças respiratórias, doenças intestinais e doenças reprodutivas [11, 35]. Assim, neste estudo distribuíram-se as diferentes bactérias e vírus pelo tipo de doença que originam.

No Gráfico 2 estão evidenciadas as taxas de incidência dos vários grupos de doenças. Como seria de esperar, as doenças com maior índice de incidência são as doenças respiratórias (59% dos casos). Estes resultados estão dentro do espectável, uma vez que também os agentes infecciosos responsáveis por este tipo de patologia apresentaram os maiores índices de prevalência na nossa amostragem. Tal como nos outros países da Europa, as doenças respiratórias são as mais prevalentes em suínos uma vez que, a sua disseminação é bastante fácil [157, 158].

Taxa de Incidência

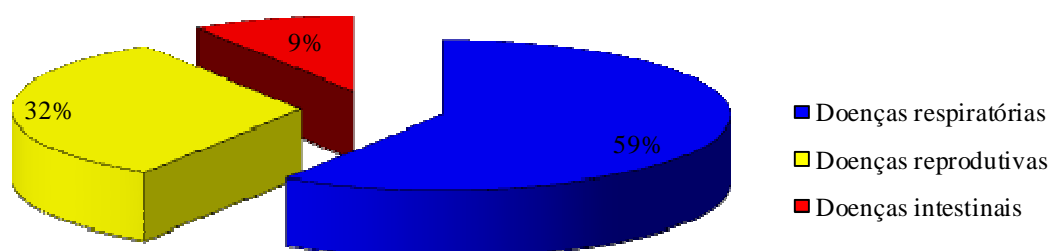


Gráfico 2 - Frequências de infecção por grupo de doença.

Actualmente, as doenças respiratórias nos suínos constituem um dos mais graves problemas enfrentados pelos suinicultores e Médicos Veterinários. A presença de doença respiratória leva à diminuição da qualidade de vida do animal, ao comprometimento da qualidade da carcaça e representa graves perdas económicas dentro do sector suinícola. O complexo de Doenças Respiratórias dos Suínos encontra-se individualizado, apesar da sua origem multifactorial, e a obtenção de uma prevenção eficaz passar pelo conhecimento dos principais envolvidos no seu desenvolvimento. Os agentes infecciosos conhecidos são diversos e podem ter origem vírica ou bacteriana. Aliados aos agentes patogénicos, temos que considerar os factores que se encontram intimamente associados ao desenvolvimento da doença respiratória, entre os quais destaca-se o manuseamento praticado e as condições ambientais presentes na exploração [157, 158].

Tabela 14- Agentes infecciosos responsáveis por doenças respiratórias.

Doenças Respiratórias		
Agentes infecciosos	Presentes (%)	Ausentes (%)
<i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i>	10	90
Gênero <i>Chlamydia</i>	11	89
<i>Circovirus-PCV 2</i>	33	67
<i>Haemophilus parasuis</i>	18	82
<i>Influenza A</i>	34	66
Gênero <i>Leptospira</i>	15	85
<i>Mycoplasma hyopneumoniae</i>	5	95
<i>Pasteurella multocida</i>	8	92
<i>PRRS</i>	35	65

Na Tabela 14 são evidenciados os agentes infecciosos responsáveis por doenças respiratórias, são eles o *Actinobacillus pleuropneumoniae*, a *Chlamydia*, o *PCV 2*, o *Haemophilus parasuis*, a *Influenza A*, a *Leptospira*, o *Mycoplasma hyopneumoniae*, a *Pasteurella multocida* e o *PRRS* [35, 156, 157]. Os agentes infecciosos responsáveis por doenças respiratórias que figuraram com mais frequência foram o *PCV 2*, a *Influenza A* e o *PRRS*, Tabela 14. Dos três o que teve maior incidência foi o *PRRS* com 35 % das amostras positivas. De todos os agentes infecciosos pesquisados o *Mycoplasma hyopneumoniae* foi a que apresentou menor percentagem de incidência com 5% das amostras positivas, Tabela 14.

As doenças intestinais apresentaram o índice de prevalência mais baixo, surgindo em 9% das amostras positivas, Gráfico 2. Estes resultados estão de acordo com os índices gerais de prevalência dos diversos agentes patogénicos. Também na Europa, as doenças intestinais dos suínos apresentam níveis residuais de incidência, uma vez que a sua disseminação é mais facilmente controlável [145, 151].

As doenças intestinais aparecem associadas ao declínio da produtividade das explorações suinícolas. A área das explorações e o número de animais presentes são factores determinantes para o controlo da doença. Para além destes factores, a qualidade da matéria-prima das rações para alimento, a limpeza e desinfecção das instalações têm

extrema importância para a prevenção deste tipo de patologias. Desta forma o diagnóstico e o controlo dos agentes infecciosos são essenciais para a prevenção e contenção de contaminações [9, 159]. Com as doenças intestinais, estão associadas as bactérias *Brachyspira*, *Chlamydia*, *Lawsonia intracellularis* e *Salmonella*. Nas 100 amostras estudadas, a incidência destas bactérias não foi muito relevante apresentando valores entre o 1% e os 11%, como podemos verificar pela análise do Gráfico 3.

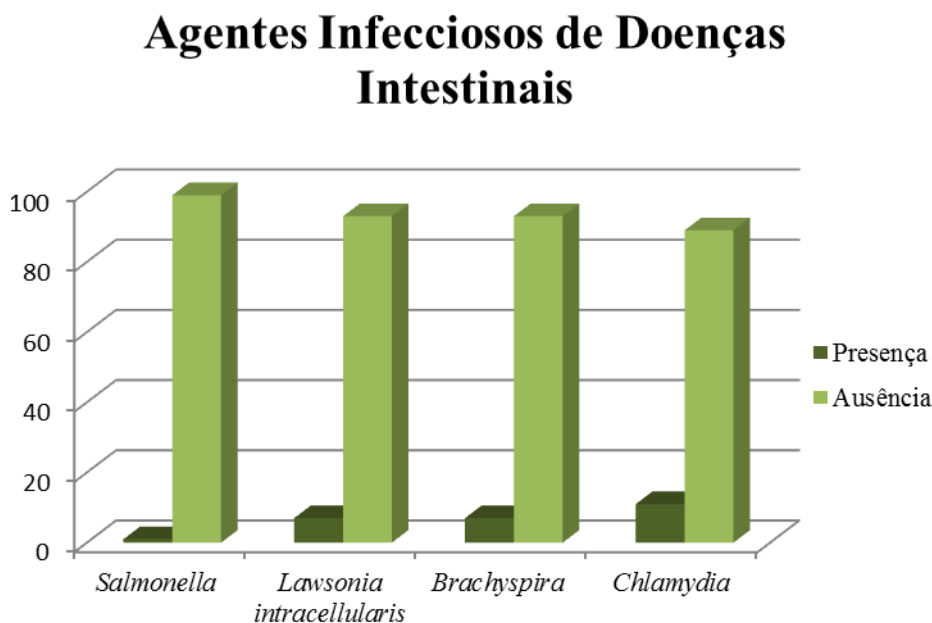


Gráfico 3 - Percentagem de incidência dos agentes infecciosos que provocam doenças intestinais.

Com um valor intermédio de prevalência aparecem as doenças reprodutivas, com 32% de incidência nas amostras estudadas. Assim como as restantes patologias também esta doença está de acordo com os índices gerais de prevalência dos diversos agentes patogénicos. Na Europa, as doenças reprodutivas dos suínos apresentam níveis de incidência consideráveis, uma vez que a sua disseminação não é facilmente controlável [158].

Agentes Infecciosos de Doenças Reprodutivas

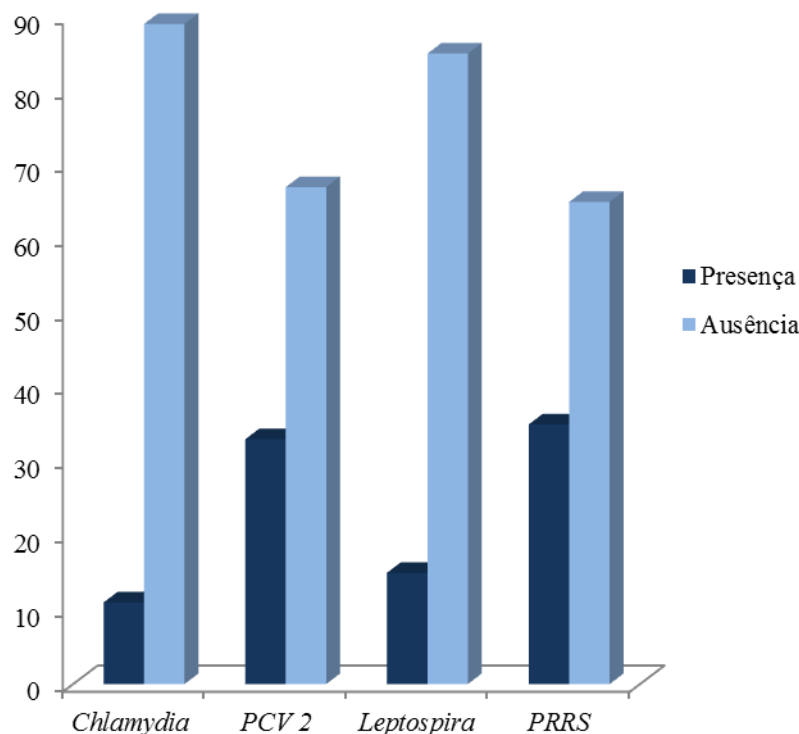


Gráfico 4 - Percentagem de incidência dos agentes infecciosos que provocam doenças reprodutivas.

As doenças reprodutivas em suínos afectam directamente o fluxo de produção diminuindo consideravelmente por consequência o lucro dos criadores. Dos agentes infecciosos pesquisados os que provocam doenças reprodutivas nos suínos por eles infectados são a *Chlamydia*, a *Leptospira*, o *PRRS* e o *PCV2*. Estes agentes são responsáveis por abortos, aumento do número de natos mortos e de fetos mumificados, diminuição da taxa de partos, além do retorno ao cio e a infertilidade nas fêmeas [11, 158]. Nas amostras estudadas o que surgiu com mais frequência foi o *PRRS*, tendo uma percentagem de incidência de 35%, seguindo-se o *PCV2* com 33%, posteriormente a *Leptospira* com 15% e finalmente a *Chlamydia* com 11%, Gráfico 4. Segundo a literatura, o *PRRS* é um vírus responsável por provocar doenças respiratórias e reprodutivas em suínos. No entanto, a maioria das amostras analisadas que apresentaram incidência de *PRRS* apresentaram paralelamente incidência de *Influenza A*. Assim conclui-se que o *PRRS* esteve mais associado a doenças respiratórias do que as doenças reprodutivas. Os animais infectados com *PRRS* apresentaram sintomas de doenças respiratórias e consequentemente doenças reprodutivas por se encontrarem mais sensíveis.

Em suma, as doenças com maior índice de incidência foram as doenças respiratórias, em 59% dos casos, seguindo-se as doenças reprodutivas, com 32% e finalmente as doenças intestinais apresentaram o índice de prevalência mais baixo, com 9% dos casos. Estes resultados estão de acordo com os índices gerais de prevalência dos diversos agentes patogénicos. Na Europa as doenças respiratórias são as mais prevalentes em suínos, sendo a sua disseminação muito fácil. No caso das doenças reprodutivas a disseminação não é facilmente detectável daí o nível de incidência ser intermédio. Por fim, as doenças intestinais dos suínos apresentam níveis residuais de incidência, uma vez que a sua disseminação é mais facilmente detectável e controlável [145, 151].

5. Conclusão

Ao longo dos anos a detecção de agentes patogénicos em animais de consumo humano, nomeadamente em suínos, tem demonstrado ser um factor essencial para o sucesso da produção destes animais. É crucial para os suinicultores saber quais os animais contaminados e qual o agente patogénico responsável pela infecção. O controlo das infecções e doenças dos animais é sinónimo de êxito para a maioria das explorações. Tendo em conta o tipo de técnicas disponíveis para a detecção de agentes infecciosos em suínos, chegou-se à conclusão, com este estudo, que as técnicas de biologia molecular são actualmente as mais indicadas para este tipo de análise. A PCR apresentou taxas de sucesso bastante elevadas, demonstrando assim ser um método robusto e bastante eficaz, mesmo a baixas concentrações dos agentes infecciosos.

Com este estudo pode concluir-se que os 12 agentes infecciosos estudados provocam alterações respiratórias, reprodutivas e intestinais, em suínos. Embora com taxas de prevalência diferentes, foram encontrados os 12 agentes infecciosos nas amostras estudadas. Destes, os que tiveram maior incidência foram o *PCV 2*, a *Influenza A* e o *PRRS* com percentagens 33%, 34% e 35%, respectivamente. Estes vírus são responsáveis por doenças respiratórias, podendo o *PCV2* e *PRRS* também estarem envolvidos em doenças reprodutivas. Assim, podemos concluir que os 100 animais estudados estavam maioritariamente infectados com doenças respiratórias seguindo-se as doenças reprodutivas. Segundo a bibliografia estudada estas são as doenças que afectam com mais frequência as suiniculturas de todo o mundo, repercutindo-se em graves prejuízos para os seus produtores. Apesar da elevada prevalência dos agentes infecciosos analisados 25 % das amostras avaliadas apresentaram taxas de infecção nula, isto é, não lhes foi detectada a presença de qualquer tipo de agente infeccioso.

Este trabalho evidenciou ainda, a prevalência de infecções múltiplas, em detrimento das infecções de um único agente. Todos os agentes patogénicos investigados apresentaram infecção múltipla acima dos 27 %. Estes resultados são muito relevantes, tendo em conta, que a maioria dos tratamentos veterinários têm em consideração apenas a infecção pelo agente prevalente, tornando o tratamento dos animais contaminados ineficaz. Embora a maioria das infecções múltiplas sejam causadas por agentes pertencentes ao mesmo grupo patológico, a existência de infecções patológicas que afectam vários sistemas

do animal, colocam em causa a abordagem minimalista do tratamento direccionado a um único agente infeccioso.

Após o término deste estudo torna-se pertinente englobar a análise molecular dos agentes infecciosos na rotina sanitária dos suínos, não só pela componente financeira envolvida no sucesso da exploração, como na própria saúde pública e animal inerente ao processo de produção de carnes para consumo humano.

6. Anexos

Anexo I -Resultados de Concentração e pureza de DNA, obtidos por espectrofotometria.

Amostra	Concentração DNA (ng/μl)	Pureza: 260/280	Amostra	Concentração DNA (ng/μl)	Pureza: 260/280
1	21,7	2,13	28	12	1,92
2	37,9	2,23	29	13,6	1,97
3	51,6	1,98	30	14,6	1,04
4	49,6	1,88	31	12,7	1,89
5	70,2	2,33	32	15,2	1,99
6	16,1	1,89	33	16,5	1,87
7	10,8	1,95	34	13,1	1,33
8	4,1	1,02	35	4,7	1,67
9	9,5	1,48	36	13,2	1,88
10	9,3	1,66	37	11	1,87
11	8,1	1,47	38	12,6	1,91
12	130,1	2,44	39	79	2,34
13	7,7	1,48	40	122,4	2,43
14	5,2	1,53	41	161,3	2,37
15	163,7	2,78	42	140,1	2,44
16	158,2	2,75	43	123,8	2,32
17	70,1	2,08	44	134,6	2,56
18	138,1	2,07	45	165	2,16
19	26,7	1,98	46	161,7	2,63
20	14,2	1,94	47	128,8	2,54
21	13,1	1,99	48	137,4	2,05
22	12,6	1,98	49	120,3	2,56
23	25,7	1,94	50	81,1	1,62
24	10,3	1,98	51	136,9	1,88
25	12,2	1,94	52	137,3	2,37
26	13,5	1,93	53	163,3	1,99
27	13	1,97	54	166,4	1,86

Amostra	Concentração DNA (ng/μl)	Pureza: 260/280	Amostra	Concentração DNA (ng/μl)	Pureza: 260/280
55	79	1,97	78	6,1	1,98
56	132,9	1,99	79	142,8	2,67
57	127,1	2,01	80	112,7	2,09
58	89,5	1,98	81	128,5	2,39
59	40,1	2,23	82	124,5	2,07
60	20,3	1,99	83	125,2	2,37
61	17,1	1,99	84	132,5	2,54
62	19,8	1,91	85	130,9	2,52
63	18,9	1,08	86	102,4	2,05
64	22,3	1,34	87	83,2	1,41
65	18,1	1,68	88	147,7	2,78
66	17,2	1,89	89	136,4	2,36
67	17,7	1,78	90	125,9	2,09
68	19,1	1,8	91	58,2	1,99
69	19,6	1,02	92	111,9	2,01
70	18,1	1,07	93	119,4	2,37
71	17,2	1,01	94	44,6	1,97
72	17,3	1,01	95	25,2	1,66
73	14	1,02	96	16,2	1,07
74	15,2	2,23	97	20,8	1,94
75	15,3	1,08	98	17,5	1,75
76	130	2,55	99	16,6	1,99
77	16	1,8	100	47,5	2,35

Anexo II- Resultados de Concentração e pureza de RNA, obtidos por espectrofotometria.

Amostra	Concentração RNA (µg/mL)	Pureza: 260/280	Amostra	Concentração RNA (µg/mL)	Pureza: 260/280
1	24,08	3,52	29	75,12	1,21
2	63,24	2,85	30	43,72	1,04
3	35,68	3,5	31	68,96	1,21
4	36,96	2,04	32	32,8	2,43
5	31,08	3,53	33	52,52	1,14
6	24,32	3,46	34	33,48	2,3
7	103,08	3,13	35	41,6	3,4
8	82,92	1,3	36	92,72	1,31
9	32,6	3,38	37	45,4	2,46
10	36,24	3,43	38	75,48	1,35
11	41,24	3,29	39	52,08	1,99
12	38,08	3,29	40	33,44	2,3
13	48,4	1,42	41	59,52	2,87
14	68,32	1,27	42	52,4	2,01
15	44,8	2,78	43	85,12	1,28
16	73,64	1,34	44	48,48	2,1
17	81,04	1,45	45	89,24	1,26
18	47,28	2,04	46	53,64	2,01
19	29,96	3,47	47	44,28	1,99
20	34,84	3,56	48	40,32	3,22
21	48,16	2,04	49	33,96	2,8
22	31	1,05	50	78,72	1,32
23	35,52	3,36	51	43,08	2,03
24	70,08	1,32	52	35	1,26
25	34,08	2,05	53	58,2	2,34
26	79,04	1,37	54	48,2	1,99
27	82,68	1,28	55	51,04	3,1
28	42,68	2,04	56	41,92	2,9

Amostra	Concentração RNA (µg/mL)	Pureza: 260/280	Amostra	Concentração RNA (µg/mL)	Pureza: 260/280
57	47,28	1,42	79	89,24	1,26
58	43,08	2,15	80	33	1,05
59	82,08	1,14	81	83,9	1,3
60	41,28	2,87	82	24,08	2,22
61	41,56	1,51	83	33,4	2,55
62	46,48	2,15	84	56,7	2,17
63	65,44	2,82	85	47,4	1,98
64	53,36	1,15	86	78,9	2,01
65	29,88	3	87	41,92	2,9
66	29,16	3,01	88	35,68	2,5
67	38,96	2,16	89	52,4	2,13
68	14,56	2,74	90	71,5	1,98
69	39,68	1,98	91	84,9	1,8
70	40,32	2,15	92	102,3	1,99
71	35,6	1,99	93	53,6	2,04
72	26,72	1	94	23,8	1,99
73	49,96	2,4	95	25,9	2,1
74	49,24	1,99	96	41,28	2,68
75	48,52	2,34	97	21,8	1,97
76	48,4	1,99	98	33,7	1,78
77	35	1,26	99	76,9	2,23
78	29,88	2,03	100	78,6	1,78

7. Bibliografia

1. Grau-Roma L., Fraile L., Segalés J., Recent advances in the epidemiology, diagnosis and control of diseases caused by *porcine circovirus type 2*. The Veterinary Journal. 2011; 187: 23-32.
2. Coleman W.B., Tsongalis G.J. Molecular Diagnostics for the Clinical Laboratorian. 1st edition. New York. Springer-Verlag. 2005.
3. Schautteet K., Vanrompay D., *Chlamydiaceae* infections in pig. Veterinary Research. 2011; 42: 1-10.
4. Adler B., de la Peña Moctezuma A., *Leptospira* and leptospirosis. Veterinary Microbiology. 2010; 140: 287-296.
5. Genebox, 2011. Genebox - produção e desenvolvimento de testes de diagnóstico, Lda. in <http://www.genebox.com>, consultado em Novembro de 2010.
6. Tebbutt G.M., Does microbiological testing of foods and the food environment have a role in the control of foodborne disease in England and Wales? Journal of Applied Microbiology. 2007; 102: 883-891.
7. Deiman B., Aarle P.v., Sillekens P., Characteristics and applications of nucleic acid sequence-based amplification (NASBA). Molecular Biotechnology. 2002; 20: 163-179.
8. Harris H.D.L., Pig health and production - past, present, future. Proceedings of the 21st IPVS Congress. 2010: 1-6.
9. Yaeger M.J., Karriker L.A., Layman L., Halbur P.G., Huber G.H., Hulzen K.V., Survey of disease pressures in twenty-six niche herds in the midwestern of United States. Journal of Swine Health and Production. 2009; 17: 256-263.
10. Golberg T.L., An evolutionary view of disease emergence: Why and how organisms become pathogens, and implications for emerging disease. AASV Annual Meeting Seminar. 2006: 373-374.
11. Mogollón J.D., Jaimes J., Vera V., Díaz A., Rincón M.A., Díaz C., Importância do diagnóstico frente às doenças emergentes na Suinicultura. 2008 in

<http://www.suinosecia.com.br/26/htmls/sanidade2.html>, consultado em Dezembro de 2010.

12. Pallares F.J., Ospriessing P.G., Sorden S.D., *Porcine Circovirus type 2 (PCV2)* co-infections in US field cases of Post weaning Multisystemic Wasting Syndrome (PMWS). *Journal Veterinary Diagnostic Investigation*. 2002; 19: 515-519.
13. Benfield D.A., The impact of viral ecology and evolution on the science of managing viral diseases of swine. *AASV Annual Meeting*. 2008: 377-383.
14. Gebhart C.J., Jones G.F., Mcorist S., Lawson G.H.K., *Porcine Proliferative Enteropathy Etiology and Pathogenesis*. Allen D.Leman Swine Conference. 1993: 139-141.
15. Yaager M., Diagnosis of PCV2 associated disease - A diagnostic pathologist perspective. *AASV Annual Meeting Seminar*. 2007; 1: 519-523.
16. Belák S., The molecular diagnosis of porcine viral diseases: A review *Acta Veterinaria Hungarica*. 2005; 53: 113-124.
17. To K., Li I., Hung I., Cheng V., Yuen K.-Y., Pathogenesis of pandemic H1N1 2009 *influenza* virus infection and the implication on management. *Frontiers of Medicine in China*. 2010; 4: 147-156.
18. Richards G.P., Limitations of molecular biological techniques for assessing the virological safety of foods. *Journal of Food Protection*. 1999; 62: 691-697.
19. Olsen S.C., Thoen C.O., Cheville N.F., (2010). *Brucella*. In: Gyles, C.L., Prescott, J.F., Songer, J.G., Thoen, C.O., editors. *Pathogenesis of Bacterial Infections in Animals*. 4th edition. Singapore: Wiley-Blackwell. p. 429-441.
20. Leeuwen W.B.V., Molecular Diagnostics in Clinical Microbiology. *Iranian Journal of Microbiology*. 2009; 1: 5-20.
21. Christensen H., Bisgaard M., Revised definition of *Actinobacillus* sensu stricto isolated from animals: A review with special emphasis on diagnosis. *Veterinary Microbiology*. 2004; 99: 13-30.
22. Rycroft A.N., Garside L.H., *Actinobacillus* species and their role in animal disease. *The Veterinary Journal*. 2000; 159: 18-36.

23. Coelho A.C., Vieira-Brito F.J., Vieira-Brito M.G., Rodrigues J., Swine pleuropneumonia due to *Actinobacillus pleuropneumoniae* - diagnosis and strategies of control. *Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias*. 2004; 99: 193-198.
24. Sachse K., Frey J., (2003). *Methods in Molecular Biology: PCR Detection of Microbial Pathogens*. 1st edition. New Jersey: Humana Press.
25. Fittipaldi N., Broes A., Harel J., Kobisch M., M. G., Evaluation and field validation of PCR tests for detection of *Actinobacillus pleuropneumoniae* in subclinically infected pigs. *Journal Clinical Microbiology*. 2003; 41: 5085-5093.
26. Mauch C., Bilkei G., *Actinobacillus suis* a potential cause of abortion in gilts and low parity sows. *The Veterinary Journal*. 2004; 168: 186-187.
27. Chae C., A review of *Porcine Circovirus 2* - associated syndromes and diseases. *The Veterinary Journal*. 2005; 169: 326-336.
28. Chang G.N., Hwang J.F., Chen J.T., Tsen H.Y., Wang J.J., Fast Diagnosis and Quantification for *Porcine Circovirus Type 2 (PCV-2)* Using Real-Time Polymerase Chain Reaction. *Journal of Microbiology, Immunology and Infection*. 2010; 43: 85-92.
29. Faurez F., Dory D., Grasland B., Jestin A., Replication of *porcine circoviruses*. *Virology Journal*. 2009; 60: 1-8.
30. Yi J., Liu C., Molecular characterization of *porcine circovirus 2* isolated from diseased pigs co-infected with porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Virology Journal*. 2010; 7: 1-4.
31. McKillen J., Hjertner B., Millar A., McNeilly F., Belák S., Adair B., Allan G., Molecular beacon real-time PCR detection of swine viruses. *Journal of Virological Methods*. 2007; 140: 155-165.
32. Liu J., Chen I., Kwang J., Characterization of a Previously Unidentified Viral Protein in *Porcine Circovirus Type 2* - Infected Cells and Its Role in Virus-Induced Apoptosis. *The Journal of Virology*. 2005; 79: 8262-8274.
33. Andraud M., Rose N., Grasland B., Pierre J.S., Jestin A., Madec F., Influence of husbandry and control measures on *porcine circovirus type 2 (PCV-2)* dynamics within a farrow-to-finish pig farm: A modelling approach. *Preventive Veterinary Medicine*. 2009; 92: 38-51.

34. Sinha A., Shen H.G., Schalk S., Beach N. M., Huang Y. W., Halbur P. G., Meng X. J., Opriessnig T., Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus Infection at the Time of *Porcine Circovirus Type 2* Vaccination Has No Impact on Vaccine Efficacy. *Journal Clinical and Vaccine Immunology*. 2010; 17: 1940-1945.
35. Reed Business bv, 2011. Diseases: Enzootic pneumonia in <http://www.pigprogress.net/diseases/enzootic-pneumonia-d30.html>, consultado em Dezembro de 2010.
36. Barcelos D.E., Souza R.F., Filho J.X. O., Borowski S.M., Diarreias causadas pela infecção com *Brachyspira spp.* em suínos. *Acta Scientiae Veterinariae*. 2010; 38: 229-245.
37. Jansson D.S., Fellström C., Råsbäck T., Vågsholm, I., Gunnarsson, A., Ingermaa, F., Johansson, K.E., Phenotypic and molecular characterization of *Brachyspira spp.* isolated from laying hens in different housing systems. *Veterinary Microbiology*. 2008; 130: 348-362.
38. La T., Phillips N.D., Hampson D.J., Development of a Duplex PCR Assay for Detection of *Brachyspira hyodysenteriae* and *Brachyspira pilosicoli* in Pig Feces. *Journal Clinical Microbiology*. 2003; 41: 3372-3375.
39. Weissenböck H., Maderner A., Herzog A.M., Lussy H., Nowotny N., Amplification and sequencing of *Brachyspira spp.* specific portions of *nox* using paraffin-embedded tissue samples from clinical colitis in Austrian pigs shows frequent solitary presence of *Brachyspira murdochii*. *Veterinary Microbiology*. 2005; 111: 67-75.
40. Novotna M., Skardová O., *Brachyspira hyodysenteriae*: detection, identification and antibiotic susceptibility. *Vet. Med.- Czech*. 2002; 47: 104-109.
41. Hansen C.F., Phillips N.D., La T., Hernandez A., Mansfield J., Kim J.C., Mullan B.P., Hampson D.J., Pluske J.R., Diets containing inulin but not lupins help to prevent swine dysentery in experimentally challenged pigs. *Journal of Animal Science*. 2010; 88: 3327-3336.
42. Råsbäck T., Fellström C., Bergsjø B., Cizek A., Collin K., Gunnarsson A., Jensen S. M., Mars A., Thomson J., Vyt P., Pringle M., Assessment of diagnostics and

- antimicrobial susceptibility testing of *Brachyspira species* using a ring test. *Veterinary Microbiology*. 2005; 109: 229-243.
43. Rohde J., Rothkamp A., Gerlach G.F., Differentiation of Porcine *Brachyspira Species* by a Novel *nox* PCR-Based Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis. *Journal Clinical Microbiology*. 2002; 40: 2598-2600.
 44. Komarek V., Maderner A., Spargser J., Weissenböck H., Infections with weakly haemolytic *Brachyspira species* in pigs with miscellaneous chronic diseases. *Veterinary Microbiology*. 2009; 134: 311-317.
 45. Szeredi L., Schiller I., Sydler T., Guscetti F., Heinen E., Corboz L., Eggenberger E., Jones G.E., Pospischil A., Intestinal *Chlamydia* in Finishing Pigs. *Veterinary Pathology*. 1996; 33: 369-374.
 46. Xu M.J., He Y., Liang R., Zhou D.H., Lin R.Q., Yin C.C., He X.H., Liang M., Zhu X.Q., Seroprevalence of *Chlamydia* Infection in Pigs from Intensive Farms in Southern China. *Journal of Animal and Veterinary Advances*. 2010; 9: 1143-1145.
 47. Everett K.D.E., Bush R.M., Andersen A.A., Emended description of the order *Chlamydiales*, proposal of *Parachlamydiaceae* fam. nov. and *Simkaniaceae* fam. nov., each containing one monotypic genus, revised taxonomy of the family *Chlamydiaceae*, including a new genus and five new species, and standards for the identification of organisms. *International Journal of Systematic Bacteriology*. 1999; 49: 415-440.
 48. Pantchev A., Sting R., Bauerfeind R., Tyczka J., Sachse K., Detection of all *Chlamydophila* and *Chlamydia spp.* of veterinary interest using species-specific real-time PCR assays. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*. 2009; 33: 473-484.
 49. Hotzel H., Berndt A., Melzer F., Sachse K., Occurrence of *Chlamydiaceae spp.* in a wild boar (*Sus scrofa* L.) population in Thuringia (Germany). *Veterinary Microbiology*. 2004; 103: 121-126.
 50. Pollmann M., Nordhoff M., Pospischil A., Tedin K., Wieler L.H., Effects of a Probiotic Strain of *Enterococcus faecium* on the Rate of Natural *Chlamydia* Infection in Swine. *Infection and Immunity*. 2005; 73: 4346-4353.

51. Héchard C., Grépinet O., DNA vaccination against *Chlamydiaceae*: current status and perspectives. *Veterinary Research*. 2004; 35: 149-161.
52. Kauffold J., Melzer F., Henning K., Schulze K., Leiding C., Sachse K., Prevalence of *chlamydiae* in boars and semen used for artificial insemination. *Theriogenology*. 2006; 65: 1750-1758.
53. Machry L., Ribeiro R.L., Vital-Brazil J.M., Balassiano I. T., Oliveira I. C. M., Avelar K.E.S., Pereira M. M., Characterization of *Leptospira sp* reference strains using the pulsed field gel electrophoresis technique. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 2010; 43: 166-169.
54. Stoddard R.A., Gee J.E., P.Wilkins P., McCaustland K., Hoffmaster A.R., Detection of pathogenic *Leptospira spp.* through TaqMan polymerase chain reaction targeting the *LipL32* gene. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*. 2009; 64: 247-255.
55. Niwetpathomwat A., Luengyosluechakul S., Geawduanglek S., A serological investigation of leptospirosis in sows from central Thailand. *Southeast Asian Journal of Tropical Medecine Public Health*. 2006; 37: 716-719.
56. Soto F.R.M., Vasconcellos S.A., Pinheiro S.R., Bernarsi F., Camarg S.R., Leptospirose Suína. *Arquivo do Instituto Biológico*. 2007; 74: 379-395.
57. Levett P.N., Morey R.E., Galloway R.L., Turner D.E., Steigerwalt A.G., Mayer L.W., Detection of pathogenic leptospires by real-time quantitative PCR. *Journal of Medical Microbiology*. 2005; 54: 45-49.
58. Azevedo S.S., Soto R.M., Morais Z.M., Pinheiro S.R., Vuaden E.R., Batista C.S.A., Souza G.O., Delbem A.C.B., Gonçalves A.P., Vasconcellos S.A., Frequency of Anti-Leptospire Agglutinins in Sows from a Swine herd in the Ibiúna Municipality, State of São Paulo, Brazil. *Arquivo do Instituto Biológico*. 2006; 73: 97-100.
59. Österberg J., *Salmonella* in Pigs: Infection Dynamics of Different Serotypes. In Department of Clinical Sciences. Uppsala, Faculty of Veterinary Medicine and Animal Sciences. *Acta Universitatis Agriculturae Sueciae*. 2010:75
60. Nowak B., Müffling T. V., Chaunchom S., Hartung J., *Salmonella* contamination in pigs at slaughter and on the farm: A field study using an antibody ELISA test and a PCR technique. *International Journal of Food Microbiology*. 2007; 115: 259-267.

61. Moulton K., Ryan P., Lay D., Postmortem photonic imaging of lux-modified *Salmonella Typhimurium* within the gastrointestinal tract of swine after oral inoculation in vivo. *Journal of Animal Science*. 2009; 87: 2239-2244.
62. Stankevicius A., Wasyl D., Jablonski A., Stankeviciene M., Pejsak Z., One-Tube nested PCR for the detection of *Salmonella* sp. in Swine Faeces. *Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy*. 2006; 50: 35-39.
63. Rodriguez-Buenfil J.C., Alvarez-Fleites M., Segura-Correa J.C., Incidence of *Salmonellosis* and identification of serogroups and serotypes in a pig commercial farm in Yucatan. *Revista Latinoamericana de Microbiologia*. 2006; 48: 10-13.
64. Foley S.L., Lynne A.M., Nayak R., *Salmonella* challenges: Prevalence in swine and poultry and potential pathogenicity of such isolates. *Journal of Animal Science*. 2008; 86: E149-E162.
65. Weigel R.M., Nucera D., Qiao B., Teferedegne B., Suh D.K., Barber D.A., Bahnson P.B., Isaacson R.E., White B.A., Testing an ecological model for transmission of *Salmonella enterica* in swine production ecosystems using genotyping data. *Preventive Veterinary Medicine*. 2007; 81: 274-289.
66. Lim S-K, Byun J-R, Nam H-M, Lee H-S, Jung S-C, Phenotypic and Genotypic Characterization of *Salmonella* spp. Isolated from Pigs and their Farm Environment in Korea. *Journal of Microbiology and Biotechnology*. 2011; 21: 50-54.
67. Swanenburg M., Urlings H.A.P., Snijders J.M.A., Keuzenkamp D.A., Knapen F.v., *Salmonella* in slaughter pigs: prevalence, serotypes and critical control points during slaughter in two slaughterhouses. *International Journal of Food Microbiology*. 2001; 70: 243-254.
68. Love B.C., Rostagno M.H., Comparison of five culture methods for *Salmonella* isolation from swine fecal samples of known infection status. *Journal Veterinary Diagnostic Investigation*. 2008; 20: 620-624.
69. Sisak F., Havlickova H., Hradecka H., Rychlik I., Kolackova I., Karpiskova R., Antibiotic resistance of *Salmonella* spp. isolates from pigs in the Czech Republic. *Journal Veterinari Medicina*. 2006; 51: 303-310.

70. Olvera A., Segalés J., Aragón V., Update on the diagnosis of *Haemophilus parasuis* infection in pigs and novel genotyping methods. The Veterinary Journal. 2007; 174: 522-529.
71. Oliveira S., Pijoan C., *Haemophilus parasuis*: New trends and diagnosis, epidemiology and control. Journal Veterinary Microbiology. 2004; 94: 1-12.
72. Olvera A., Cerdà-Cuellar M., Mentaberre G., Casas-Díaz E., Lavin S., Marco I., Aragón V., First isolation of *Haemophilus parasuis* and other NAD-dependent *Pasteurellaceae* of swine from European wild boars. Journal Veterinary Microbiology. 2007; 125: 182-186.
73. Nedbalcova K., Satran P., Jaglic Z., Ondriasova R., Kucerova Z., *Haemophilus Parasuis* and Glasser's disease in pigs: a review. Veterinarni Medicina. 2006; 51: 168-179.
74. Bahamonde F.J., 2011. Aprendiendo sobre porcino. in <http://francisco47.wordpress.com/category/patologia/respiratoria/>, consultado em Janeiro de 2011.
75. Gramer M.R., Diagnostic notes: Defining swine *influenza* virus. Journal of Swine Health and Production. 2005; 13: 157-160.
76. Sreta D., Kedkovid R., Tuamsang S., Kitikoon P., Thanawongnuwech R., Pathogenesis of *swine influenza virus* (Thai isolates) in weanling pigs: an experimental trial. Virology Journal. 2009; 6: 34.
77. Thacker E., Janke B., Swine *Influenza Virus*: Zoonotic Potential and Vaccination Strategies for the Control of Avian and Swine *Influenzas*. Journal of Infectious Diseases. 2008; 197: 19-24.
78. Brown I.H., The epidemiology and evolution of *influenza* viruses in pigs. Journal Veterinary Microbiology. 2000; 74: 29-46.
79. Markowska-Daniel I., Stankevicius A., Seroprevalence of Antibodies against Swine *Influenza Virus* in Pigs of Different age. Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy. 2005; 49: 3-7.
80. Jung T., Choi C., Chae C., Localization of Swine *Influenza Virus* in Naturally Infected Pigs. Veterinary Pathology Online. 2002; 39: 10-16.

81. Schoenborn L., Abdollahi H., Tee W., Dyal-Smith M., Janssen P.H., A Member of the Delta Subgroup of *Proteobacteria* from a Pyogenic Liver Abscess is a Typical Sulfate Reducer of the Genus *Desulfovibrio*. *Journal Clinical Microbiology*. 2001; 39: 787-790.
82. Hubbard A. L., Harrison D. J., Moyes C., McOrist S., Direct detection of *eae*-positive bacteria in human and veterinary colorectal specimens by PCR. *Journal Clinical Microbiology*. 1998; 36: 2326-2330.
83. Zhang P., Gebhart C.J., Burden D., Duhamel G.E., Improved diagnosis of porcine proliferative enteropathy caused by *Lawsonia intracellularis* using polymerase chain reaction-enzyme-linked oligosorbent assay (PCR-ELOSA). *Molecular and Cellular Probes*. 2000; 14: 101-108.
84. Ladinig A., Sommerfeld-Stur I., Weissenböck H., Comparative Evaluation of Diagnostic Methods for *Lawsonia intracellularis* Infection in Pigs, with Emphasis on Cases Lacking Characteristic Lesions. *Journal of Comparative Pathology*. 2009; 140: 140-148.
85. Guedes R.M.C., Gebhart C.J., Onset and duration of fecal shedding, cell-mediated and humoral immune responses in pigs after challenge with a pathogenic isolate or attenuated vaccine strain of *Lawsonia intracellularis*. *Veterinary Microbiology*. 2003; 91: 135-145.
86. Zmudzki J., Osek J., Stankevicius A., Pejsak Z., Rapid detection of *Brachyspira hyodysenteriae* and *Lawsonia intracellularis* in swine faecal and mucosal specimens by multiplex PCR. *Bulletin of the Veterinary Institute Pulawy*. 2004; 48: 207-214.
87. van der Heijden H.M.J.F., Bakker J., Elbers A.R.W., Vos J.H., Weyns A., de Smet M., McOrist S., Prevalence of exposure and infection of *Lawsonia intracellularis* among slaughter-age pigs. *Research in Veterinary Science*. 2004; 77: 197-202.
88. Reiner G., Winkelmann M., Willems H., Prevalence of *Lawsonia intracellularis*, *Brachyspira hyodysenteriae* and *Brachyspira pilosicoli* infection in hunted wild boars (*Sus scrofa*) in Germany. *European Journal of Wildlife Research*. 2010; 57: 443-448.

89. Coll T. 2009. Benefícios a longo prazo de la vacunación frente a la enteropatía proliferativa porcina. in http://www.solocerdos.es/pdf/BOsolocerdos18_2.pdf, consultado em Fevereiro de 2011.
90. Silva F.M.F., Castro L.A., Júnior A.S., Moraes M.P., Moreira M.A.S., Almeida M.R., Detection of *Mycoplasma hyopneumoniae* in lungs and nasal swabs of pigs by nested PCR. Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia. 2009; 61: 149-155.
91. Baumeister A.K., Runge M., Ganter M., Feenstra A.A., Delbeck F., Kirchhoff H., Detection of *Mycoplasma hyopneumoniae* in Bronchoalveolar Lavage Fluids of Pigs by PCR. Journal of Clinical Microbiology. 1998; 36: 1984-1988.
92. Yamaguti M., Muller E.E., Piffer A.I., Kich J.D., Klein C.S., Kuchiishi S.S., Detection of *Mycoplasma hyopneumoniae* by polymerase chain reaction in swine presenting respiratory problems. Brazilian Journal of Microbiology. 2008; 39: 471-476.
93. Pinto P., Klein C., Zaha A., Ferreira H., Comparative proteomic analysis of pathogenic and non-pathogenic strains from the swine pathogen *Mycoplasma hyopneumoniae*. Proteome Science. 2009; 7: 1-11.
94. Maes D., Segales J., Meyns T., Sibila M., Pieters M., Haesebrouck F., Control of *Mycoplasma hyopneumoniae* infections in pigs. Veterinary Microbiology. 2008; 126: 297-309.
95. Dubosson C.R., Conzelmann C., Miserez R., Boerlin P., Frey J., Zimmermann W., Hani H., Kuhnert P., Development of two real-time PCR assays for the detection of *Mycoplasma hyopneumoniae* in clinical samples. Veterinary Microbiology. 2004; 102: 55-65.
96. Calsamiglia M., Pijoan C., Trigo A., Application of a nested polymerase chain reaction assay to detect *Mycoplasma hyopneumoniae* from nasal swabs. Journal Veterinary Diagnostic Investigation. 1999; 11: 246-251.
97. Gautier A.L., Dubois D., Escande F., Avril J.L., Trieu-Cuot P., Gaillot O., Rapid and Accurate Identification of Human Isolates of *Pasteurella* and Related Species by Sequencing the *sodA* Gene. Journal of Clinical Microbiology. 2005; 43: 2307-2314.

98. Tang X., Zhao Z., Hu J., Wu B., Cai X., He Q., Chen H., Isolation, Antimicrobial Resistance, and Virulence Genes of *Pasteurella multocida* Strains from Swine in China. *Journal of Clinical Microbiology*. 2009; 47: 951-958.
99. Holst E., Rollof J., LAarsson L., Nielsen J.P., Characterization and Distribution of *Pasteurella* Species Recovered from Infected Humans. *Journal of Clinical Microbiology*. 1992; 30: 2984-2987.
100. Dziva F., Christensen H., van Leengoed L.A.M.G., Mohan K., Olsen J.E., Differentiation of *Pasteurella multocida* isolates from cases of atrophic rhinitis in pigs from Zimbabwe by RAPD and ribotyping. *Veterinary Microbiology*. 2004; 102: 117-122.
101. Dziva F., Muhairwa A.P., Bisgaard M., Christensen H., Diagnostic and typing options for investigating diseases associated with *Pasteurella multocida*. *Veterinary Microbiology*. 2008; 128: 1-22.
102. Amigot J.A., Torremorell M., Pijoan C., Evaluation of techniques for the detection of toxigenic *Pasteurella multocida* strains from pigs. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*. 1998; 10: 169-173.
103. Borowski S.M., Ikuta N., Lunge V., Fonseca A., Marques E., Cardoso M., Caracterização antigênica e fenotípica de cepas de *Pasteurella multocida* isoladas de pulmões de suínos com pneumonia e/ou pleurite. *Pesquisa Veterinária Brasileira*. 2002; 22: 97-103.
104. Westferry Circus, 2011. European Medicines Agency - Science Medicines Health. in www.ema.europa.eu, consultado em Abril de 2011.
105. Lunney J.K., Chen H., Genetic control of host resistance to porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) infection. *Virus Research*. 2010; 154: 161-169.
106. Lunney J.K., Benfield D.A., Rowland R.R.R., Porcine reproductive and respiratory syndrome virus: An update on an emerging and re-emerging viral disease of swine. *Virus Research*. 2010; 154: 1-6.
107. Indik S., Schmoll F., Sipos W., Klein D., Genetic variability of PRRS virus in Austria: consequences for molecular diagnostics and viral quantification. *Veterinary Microbiology*. 2005; 107: 171-179.

108. Greiser-Wilke I., Fiebig K., Drexler C., Beilage E.G., Genetic diversity of Porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) in selected herds in a pig dense region of North-Western Germany. *Veterinary Microbiology*. 2009; 143: 1-42.
109. Naravaneni R., Jamil K., Rapid detection of food-borne pathogens by using molecular techniques. *Journal of Medical Microbiology*. 2005; 54: 51-54.
110. Greiser-Wilke I., Blome S., Moennig V., Diagnostic methods for detection of Classical swine fever virus-Status quo and new developments. *Vaccine*. 2007; 25: 5524-5530.
111. Rodriguez J.M., Detection of animal pathogens by using the polymerase chain reaction (PCR). *The Veterinary Journal*. 1997; 153: 287-305.
112. Misra V., The Polymerase Chain Reaction (PCR) in the Diagnosis of Veterinary Infections Diseases. *Western College of Veterinary Medicine*. 2007; 7. 1-6.
113. Kok T., Wati S., Bayly B., Devonshire-Gill D., Higgins G., Comparison of six nucleic acid extraction methods for detection of viral DNA or RNA sequences in four different non-serum specimen types. *Journal of Clinical Virology*. 2000; 16: 59-63.
114. Belkum A.V., Molecular typing of micro-organisms: at the centre of diagnostics, genomics and pathogenesis of infectious diseases. *Journal of Medical Microbiology*. 2002; 51: 7-10.
115. Belkum A.V., Struelens M., Visser A.d., Verbrugh H., Tibayrenc M., Role of Genomic Typing in Taxonomy, Evolutionary Genetics, and Microbial Epidemiology. *Clinical Microbiology Reviews*. 2001; 14: 547-560.
116. Mesquita R.A., Anzai E.K., Oliveira R.N., Nunes F.D., Evaluation of three methods of extraction from paraffin-embedded material for the amplification of genomic DNA by means of the PCR technique. *Pesquisa Odontológica Brasileira*. 2001; 15: 314-319.
117. Videira A., (2001). *Engenharia Genética - Princípios e Aplicações*. 2ª edição. Lisboa. Lidel - Edições Técnicas, Lda.
118. Yang S., Rothman R.E., PCR-based diagnostics for infectious diseases: uses, limitations, and future applications in acute-care settings. *The Lancet Infectious Diseases*. 2004; 4: 337-348.

119. Olvera A., Calsamiglia M., Aragon V., Genotypic Diversity of *Haemophilus parasuis* Field Strains. *Journal Applied and Environmental Microbiology*. 2006; 72: 3984-3992.
120. Oliveira S., Galina L., Pijoan C., Development of a PCR test to diagnose *Haemophilus parasuis* infections. *Journal Veterinary Diagnostic Investigation*. 2002; 13: 495-501.
121. Angen O., Oliveira S., Ahrens P., Svensmark B., Leser T.D., Development of an improved species specific PCR test for detection of *Haemophilus parasuis*. *Journal Veterinary Microbiology*. 2007; 119: 266-276.
122. Yue M., Yang F., Yang J., Bei W., Cai X., Chen L., Dong J., Zhou R., Jin M., Jin Q., Chen H., Complete Genome Sequence of *Haemophilus parasuis* SH0165. *Journal of Bacteriology*. 2009; 191: 1359-1360.
123. Giovannacci I., Queguiner S., Ragimbeau C., Salvat G., Vendeuvre J.L., Carlier V., Ermel G., Tracing of *Salmonella spp.* in two pork slaughter and cutting plants using serotyping and macrorestriction genotyping. *Journal of Applied Microbiology*. 2001; 90: 131-147.
124. Gabe J.D., Chang R.J., Slomiany R., Andrews W.H., Mccaman M.T., Isolation of Extracytoplasmic Proteins from *Serpulina hyodysenteriae* B204 and Molecular Cloning of the *flaB1* Gene Encoding a 38-Kilodalton Flagellar Protein. *Journal Infection and Immunity*. 1995; 63: 142-148.
125. Atyeoa R.F., Stantonb T.B., Jensen N.S., Suriyaarachichia D.S., Hampson D.J., Differentiation of *Serpulina* species by NADH oxidase gene (nox) sequence comparisons and nox-based polymerase chain reaction tests. *Journal Veterinary Microbiology*. 1999; 67: 47-60.
126. Rayamajhi N., Shin S.J., Kang S.G., Lee D.Y., Ahn J.M., Yoo H.S., Development and use of a multiplex polymerase chain reaction assay based on Apx toxin genes for genotyping of *Actinobacillus pleuropneumoniae* isolates. *Journal Veterinary Diagnostic Investigation*. 2005; 17; 359-362.
127. Gram T., Ahrens P., Andreasen M., Nielsen J.P., An *Actinobacillus pleuropneumoniae* PCR typing system based on the *apx* and *omlA* genes - evaluation

- of isolates from lungs and tonsils of pigs. *Journal Veterinary Microbiology*. 2000; 75: 43-57.
128. Zhou L., Jones S.C.P., Angen O., Bosse J.T., Nash J.H.E., Frey J., Zhou R., Chen H.C., Kroll J.S., Rycroft A.N., Langford P.R., Multiplex PCR That Can Distinguish between Immunologically Cross- Reactive Serovar 3, 6, and 8 *Actinobacillus pleuropneumoniae* Strains. *Journal of Clinical Microbiology*. 2008; 46: 800-803.
 129. Finsterbusch T., Mankertz A., Porcine circoviruses-Small but powerful. *Journal Virus Research*. 2009; 147: 177-183.
 130. Gagnon C.A., Castillo J.R.E.D., Music N., Fontaine G., Harel J., Tremblay D., Development and use of a multiplex real-time quantitative polymerase chain reaction assay for detection and differentiation of *Porcine circovirus-2* genotypes 2a and 2b in an epidemiological survey. *Journal Veterinary Diagnostic Investigation*. 2008; 20: 545-558.
 131. Lyoo K.S., Kim H.B., Joo H.S., Evaluation of a nested polymerase chain reaction assay to differentiate between two genotypes of *Porcine circovirus-2*. *Journal Veterinary Diagnostic Investigation*. 2008; 20: 283-288.
 132. Strait E.L., Madsen M.L., Minion F.C., Hennings J.F., Dammen M., Jones K.R., Thacker E.L., Real-Time PCR Assays To Address Genetic Diversity among Strains of *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Journal of Clinical Microbiology*. 2008; 46: 2491-2498.
 133. Mattsson J.G., Bergstrom K., Wallgren P., Johansson K.E., Detection of *Mycoplasma hyopneumoniae* in Nose Swabs from Pigs by In Vitro Amplification of the 16S rRNA Gene. *Journal of Clinical Microbiology*. 1995; 33: 893-897.
 134. Baumeister A.K., Runge M., Ganter M., Feenstra A.A., Delbeck F., Kirchhoff H., Detection of *Mycoplasma hyopneumoniae* in Bronchoalveolar Lavage Fluids of Pigs by PCR. *Journal of Clinical Microbiology*. 1998; 36: 1984-1988.
 135. Guarino H., Goyal S.M., Murtaugh M.P., Morrison R.B., Kapur V., Detection of porcine reproductive and respiratory syndrome virus by reverse transcription–polymerase chain reaction using different regions of the viral genome. *Journal Veterinary Diagnostic Investigation*. 1999; 11: 27-33.

136. Wasilk A., Callahan J.D., Christopher-Hennings J., Gay T. A., Fang Y., Dammen M., Reos M. E., Torremorell M., Polson D., Mellencamp M., Nelson E., Nelson W. M., Detection of U.S., Lelystad, and European-Like *Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Viruses* and Relative Quantitation in Boar Semen and Serum Samples by Real-Time PCR. *Journal of Clinical Microbiology*. 2004; 42: 4453-4461.
137. Hermann J.R., Hoff S.J., Yoon K.J., Burkhardt A.C., Evans R.B., Zimmerman J.J., Optimization of a Sampling System for Recovery and Detection of Airborne *Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus* and *Swine Influenza Virus*. *Journal Applied and Environmental Microbiology*. 2006; 72: 4811-4818.
138. Choi Y.K., Goyal S.M., Kang S.W., Farnham M.W., Joo H.S., Detection and subtyping of swine *influenza* H1N1, H1N2 and H3N2 viruses in clinical samples using two multiplex RT-PCR assays. *Journal of Virology Methods*. 2002; 102: 53-59.
139. Gramer M.R., Defining swine *influenza* virus. *Journal Swine Health and Production*. 2005; 13: 157-160.
140. Brown I.H., The epidemiology and evolution of *influenza* viruses in pigs. *Journal Veterinary Microbiology*. 2000; 74: 29-46.
141. Qiagen, 2011. Quiagen handbooks. in <http://www.qiagen.com>, consultado em Abril de 2011.
142. Fermentas, 2011. Fermentas DNA Rulers and DNA Markers images. in http://www.fermentas.com/templates/files/tiny_mce/family_images/sm031_fam.jp, consultado em Abril de 2011.
143. Sambrook J., Russell D.W., *Molecular Cloning: A laboratory Manual*. 3th edition. New York. Cold Spring Harbor Laboratory Press. (2001).
144. Moorkamp L., Nathues H., Spargser J., Tegeler R., Beilage E.G., Detection of respiratory pathogens in porcine lung tissue and lavage fluid. *The Veterinary Journal*. 2008; 175: 273-275.
145. Suh D.K., Song J.C., Prevalence of *Lawsonia intracellularis*, *Brachyspira hyodysenteriae* and *Salmonella* in swine herds. *Journal of Veterinary Science*. 2005; 6: 289-293.

146. Fraile L., Calsamigli M., Mateu E., Espinal A., Cuxart A., Seminati C., Martín M., Domingo M., Segalés J., Prevalence of infection with *porcine circovirus-2* (PCV-2) and *porcine reproductive and respiratory syndrome virus* (PRRSV) in an integrated swine production system experiencing postweaning multisystemic wasting syndrome. The Canadian Journal of Veterinary Research. 2009; 73: 308-312.
147. Maldonado J., Reeth K.V., Riera P., Sitja M., Saubi N., Espunã E., Artigas C., Evidence of the concurrent circulation of H1N2, H1N1 and H3N2 *influenza A* viruses in densely populated pig areas in Spain. The Veterinary Journal. 2006; 172: 377-381.
148. Rocha T., A review of leptospirosis in farm animals in Portugal. Journal Revue Scientifique. 1998; 17: 699-712.
149. Nathues H., Kubiak R., Tegeler R., Beilage E., Occurrence of *Mycoplasma hyopneumoniae* infections in suckling and nursery pigs in a region of high pig density. Journal Veterinary Record. 2010; 166: 194-198.
150. O'Sullivan T., Friendship R., Blackwell T., Pearl D., McEwen B., Carman S., Slavić D., Dewey C., Microbiological identification and analysis of swine tonsils collected from carcasses at slaughter. The Canadian Journal of Veterinary Research. 2011; 75: 106-111.
151. Baptista F.M., *Salmonella* in pigs and pork in Denmark and Portugal: Use of risk-based principles to achieve cost-effective surveillance strategies. Denmark, Faculty of Life Sciences - Department of Large Animal Sciences, University of Copenhagen. (2010).
152. Phillips N.D., La T., Adams P.J., Harland B.L., Fenwick S.G., Hampson D.J., Detection of *Brachyspira hyodysenteriae*, *Lawsonia intracellularis* and *Brachyspira pilosicoli* in feral pigs. Veterinary Microbiology. 2009; 134: 294-299.
153. Stege H., Jensen T.K., Møller K., Vestergaard K., Baekbo P., Jorsal S.E., Infection dynamics of *Lawsonia intracellularis* in pig herds. Veterinary Microbiology. 2004; 104: 197-206.
154. Brandt D., Kaim U., Baumgärtner W., Wendt M., Evaluation of *Lawsonia intracellularis* infection in a group of pigs in a subclinically affected herd from weaning to slaughter. Veterinary Microbiology. 2010; 146: 361-365.

155. Palaniappan R.U.M., Chang Y.F., Chang C.F., Pan M.J., Yang C.W., Harpending P., McDonough S.P., Dubovi E., Divers T., Qu J., Roe B., Evaluation of lig-based conventional and real time PCR for the detection of pathogenic *leptospire*s. Molecular and Cellular Probes. 2005; 19: 111-117.
156. Benchmark Holdings, Ltd. 2011. The pig site - disease information. in <http://www.thepigsite.com/diseaseinfo/>, consultado em Abril de 2011.
157. Choi Y.K., Goyal S.M., Joo H.S., Retrospective analysis of etiologic agents associated with respiratory diseases in pigs. Journal Canadian Veterinary. 2003; 44: 735-737.
158. Ruiz-Fons F., Segalés J., Gortázar C., A review of viral diseases of the European wild boar: Effects of population dynamics and reservoir rôle. The Veterinary Journal. 2008; 176: 158-169.
159. Bazargani T.T., Rafia S., Movassaghi A.R., Moaddab S.H., Gastrointestinal infection with *Brachyspira spp.* in a filly with chronic diarrhea: a case report. International Journal of Veterinary Research. 2010; 4: 81-85.